Die Bedingungen für die Pigmentbildung durch Epicoccum purpurascens (Ehrenberg.)

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

GENEHMIGT

VON DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT

ZU BERLIN.

Von

Karl W. Naumann

aus Leipzig.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Tag der Promotion: 13. August 1910.

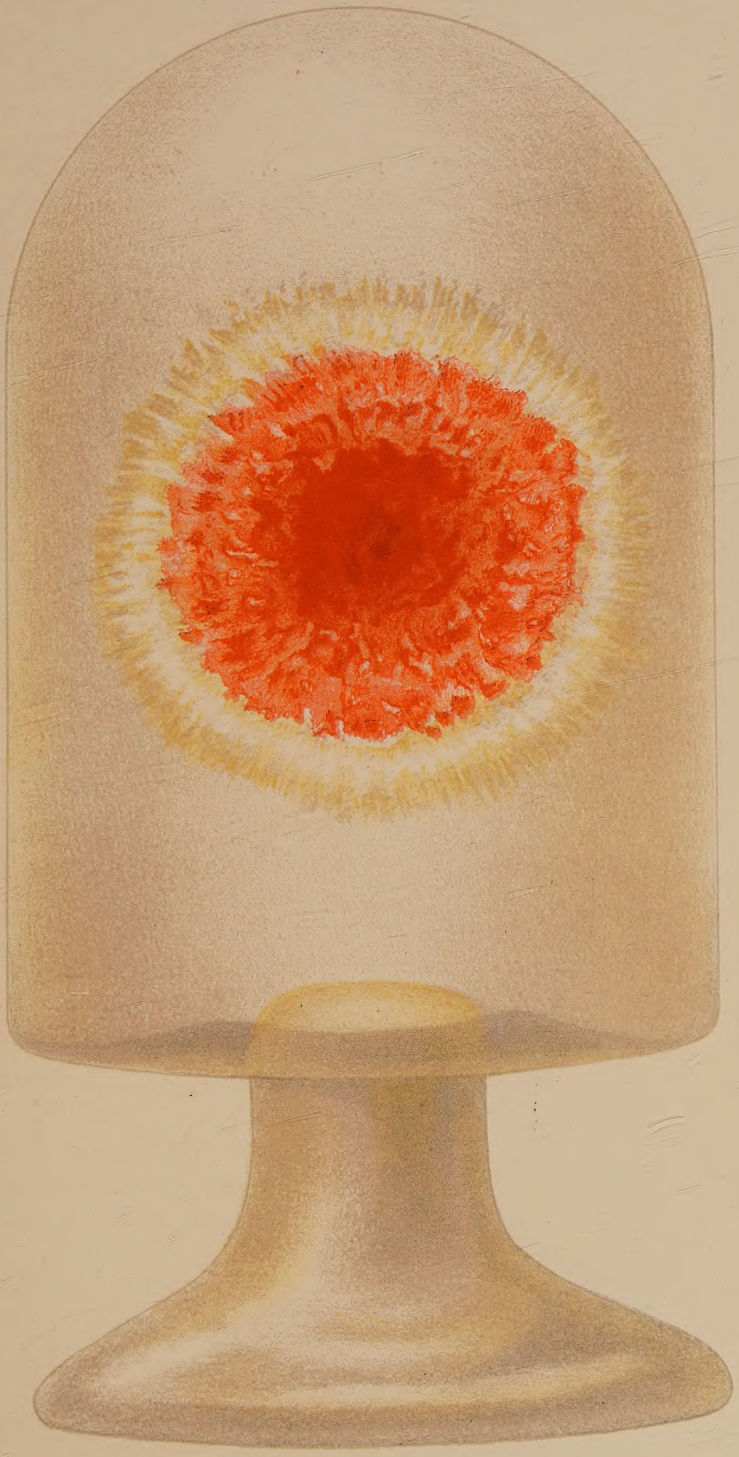
Referenten:

Prof. Dr. **Schwendener.**

Prof. Dr. **Gabriel.**

Emil Ebering, Berlin NW. 7, Mittelstr. 39.

Meiner lieben Mutter.



Inhalt.

Frühere Untersuchungen S. 8.
Epicoccum purpurascens (Ehrenberg) S. 15.
Eigene Untersuchungen S. 19.
1. Der Einfluß der Nährsalze S. 23.
2. Die Kohlehydrate S. 28.
Der Nachweis der Diastase S. 32.
Der Einfluß der Stickstoffnahrung S. 33.
Der Luftstickstoff S. 33.
Der Stickstoff in Ammon, Nitrit und Nitratverbindungen S. 35.
Einfluß von N in verschieden hoher Konzentration S. 41.
3. Die organischen Stickstoffverbindungen S. 42.
Mycelernte und Bildung von Alkohol unter Zugabe verschiedener Stickstoffquellen S. 45.
Die Bildung von Alkohol und der Mycelernte bei verschiedenen Stickstoff-Quellen S. 48.
4. Der Einfluß der Reaktion S. 49.
5. Der Einfluß des osmotischen Druckes S. 51.
6. Der Einfluß der Temperatur S. 53.
7. Der Einfluß des Lichtes S. 54.
8. Der Einfluß verschiedener Gase S. 56.
9. Die Reizwirkung durch Bakterien S. 59.
Versuche mit Nährgelatinen von bekannter Zusammensetzung S. 61.
Der Farbstoff S. 65.
a) Die Gewinnung S. 65.
b) Der Farbstoff S. 67.
1. Das purpurrote Pigment S. 68.
2. Das braunrote Pigment S. 69.
3. Versuch zu einem Vergleich mit den Pigmenten anderer Schimmelpilze S. 71.
Zusammenfassung S. 74.
Literaturverzeichnis S. 77.

Ueber die biochemischen Bedingungen der Farbstoffbildung durch Pflanzen ist im allgemeinen sehr wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit soll in der Hauptsache feststellen, welche äußeren Einflüsse chemischer und physikalischer Art notwendig sind, um nach Belieben einen Schimmelpilz, Epicoccum purpurascens (Ehrenberg), zur Bildung seines roten Pigmentes zu veranlassen. Wenn es auch auf diese Weise nicht gelingen kann, Schlüsse auf die chemische Zusammensetzung des Farbstoffes zu ziehen, so wird dabei doch die Möglichkeit geschaffen, einen tieferen Blick in den Chemismus dieses Pilzes zu werfen. Für chemische Untersuchungen über die Natur des Farbstoffes sind mit der Kenntnis der für die Pigmentbildung erforderlichen Bedingungen die Grundlagen gegeben, da dann der Farbstoff bildende Pilz in beliebiger Menge gezüchtet werden kann.

Bevor wir zu unserer eigentlichen Aufgabe übergehen, bei Epicoccum purpurpascens die Bedingungen der Farbstoffbildung eingehend zu untersuchen, seien frühere einschlägige Arbeiten über die Pigmentbildung anderer Schimmelpilze in Kürze chronologisch aufgeführt.

Frühere Untersuchungen.

1890 beschrieb Harz (1) einen neuen Pilz Physomyces heterosporus n. g. et n. sp., eine Spezies von Monascus. Dieser wurde in einer Seifen- und Glycerinfabrik gefunden und wuchs auf Flüssigkeiten, deren Glyceringehalt zwischen 35 und 76,8 % schwankte, bei einem Aschengehalt zwischen 2,4 und 3,1 %, und deren Temperatur von 32,8 bis 34,6 ° vorübergehend auf 50 bis 60 ° stieg. Die Massen des Mycels sind dunkelbraunrot, stellenweise carminrot. In festen Medien wurde die Farbe nicht so reichlich gebildet wie in flüssigen. Harz bezeichnete den in den Hyphen enthaltenen Farbstoff als Physomycin.

Klein (2) 1892 untersuchte einen zur Gattung Fusarium gehörenden Pilz, der manchmal Malzkörner befällt und diesen eine mehr oder weniger rote Farbe verleiht. Dieser soll in naher Verwandtschaft mit Fusarium graminearum stehen. Er wächst auf allen Nährmedien, besonders gut jedoch auf stärkehaltigen. Pigment wird nur auf Kohlehydrat enthaltenden Nährböden hervorgebracht. Sauerstoff ist zur Pigmentbildung notwendig, da submers gewachsenes Mycel stets farblos bleibt. Beim Erwärmen mit Wasser wird der nur schwach rot gefärbte Teil des Mycels dunkelrot, was nach Klein (l. c. pg. 40) darin seine Erklärung finden dürfte, daß vorhandene, leicht flüchtige Säuren, die eine kräftige Entwicklung der roten Farbe unterdrücken, schon bei Erwärmen des Wassers auf etwa 80 ° C entweichen.

Constantin (3) 1893 schreibt über einen Pilz, Eurotiopsis Gayoni, der auf Stärkekleister rot wächst, in Traubenmost

dickes rosa-weißes, manchmal blutrotes Mycel bildet. Auf Kartoffel tritt spärliches und gewöhnlich farbloses Wachstum ein. Die Perithecien sind im Most stark gefärbt, auf Kartoffeln bleiben sie weiß.

Eine gründliche Untersuchung desselben Pilzes unternahm 1896 Laborde (4). Nährböden, die außer den nötigen Mineralstoffen und Stickstoffverbindungen, Ammoniumsalze oder Nitrate, noch einen der folgenden Stoffe enthielten: Kohlehydrate wie Stärke, Dextrin, Invertzucker, Dextrose, Laevulose, Rohrzucker, Milchzucker, Invertmilchzucker, Galactose und Trehalose, sicherten ein gutes Gedeihen des Pilzes. Das Wachstum war weniger ergiebig bei Zugabe von Amygdalin, Koniferin, Salicin, Aethylalkohol, Butter und einem Oel (Olivenöl?). Die Farbstoffbildung erwähnt Laborde nur beiläufig, z. B. die Bildung von rosafarbenem Mycel auf mannithaltigen Nährböden und Stärkekleister. Auf Milch trat blutrote Färbung ein, wobei jene unter dem Einfluß des Pilzes alkalisch wurde und ungeronnen blieb; das Kasein und der Milchzucker wurden vom Pilz aufgebraucht. Weizenmehlkleister wurde ebenfalls unter dem Einfluß des Pilzes alkalisch, doch weniger als die Milch. Der Pilz färbt sich auf ihm noch intensiver rot. Die Farbstoffproduktion fiel auf neutralem, schwachsaurem und alkalischem Boden am reichlichsten aus. Stark saure Reaktion verhinderte die Farbstoffbildung. In mit Milchsäurebakterien geimpfter Milch wuchs der Pilz zunächst untergetaucht und wurde rot wie in steriler Milch. Bei zunehmendem Säuregehalt hört der Pilz auf, den Farbstoff hervorzubringen.

Der bekannte Farbstoff Ang Khak, der in China und Ostindien vielfach zum Färben von Lebensmitteln Verwendung findet, wird durch einen Monascus erzeugt, den Went (5) 1895 als Monascus purpureus beschrieben hat. Uyeda (6) untersuchte 1901 Material desselben Pilzes aus Formosa. Der Farbstoff ist in dem Protoplasma enthalten, nicht in dem Zellsaft. Untergetauchtes Material bleibt

durchweg farblos, anscheinend infolge Sauerstoffmangels, da es nachträglich an der Luft rot wird. Der Pilz lebt durchaus nur aerob. Die Zusammensetzung des Nährbodens soll auf die Entwicklung des Pigmentes nur indirekten Einfluß haben. Je kräftiger das Wachstum, umso intensiver die Farbstoffbildung.

E. F. Smith (7) untersuchte 1899 den Erreger einer vielgefürchteten Krankheit der Baumwollpflanze, des „cowpea" (Vigna catjang) und der Wassermelone. Seiner Konidienbildung nach gehört der Pilz zur Gattung Fusarium, seine Ascosporenfrucht erweist seine Zugehörigkeit zu Neocosmospora vasinfecta. Auf verschiedenen Nährböden wird roter Farbstoff produziert, besonders auf gekochtem Reis.

„On neutral or acid media", schreibt Smith, „in the present of free oxygen and of starchy foods — e. g. potato, bread, rice, tapioca, wheat, hominy, cucumber agar etc. — this fungus develops in the substratum a series of the most brilliant colors, which are then absorbed by the hyphae. These hues include many shades of pink, red, purple, and violet, and in some of the substrata — e. g. bread or boiled rice — are particularly brilliant, changing gradually from shades of purple and rose color in the deepest crimson. During the development of this pigment the substratum becomes intensely acid (mostly CO_2, but some lactic acid . . .). If, however, alkaline substances (caustic lime, carbonate of soda etc.) be added to the substratum in advance, so as to neutralize the acid or acids as fast as formed, no color is developed, the fungus remaining snow white, as in the vessels of the melon plant. If less alkali be added, the colors appear gradually after a time, which is longer or shorter to the amount added.

1897 berichtet van den Dries (8) über einige Erfahrungen mit Fusarium hordei. Auf stärkereichen Nährböden sind die dem Substrat unmittelbar aufliegenden Mycelteile rosenrot gefärbt, bei günstigen Medien z. B. Brot getränkt mit

Raulins Nährlösung, ist die Färbung intensiver und wird scharlach-, purpur- oder schwarzrot.

Smith und Swingle (9) unternahmen 1904 die Untersuchung des Erregers einer in Amerika und Europa beobachteten Kartoffelkrankheit, Fusarium oxysporum Schlecht, der vielleicht mit einem von Schacht (10) 1856 geprüften Untersuchungsobjekt identisch ist. Am Licht kultiviert, wird der Pilz schön lachsfarben. In rotem Licht (hinter Kaliumbichromat) blieb die Pigmentbildung aus, während sie in blauem Licht (hinter Kupferoxydulammoniak) eintrat. Ebenso verhielt sich Neocosmospora vasinfecta, der Erreger der schon erwähnten Vigna-Krankheit. Dies Fusarium bringt außer dem lachsfarbigen Pigment auf vielen Nährböden unabhängig von der Beleuchtung einen rosenroten, oder violetten Farbstoff hervor, am besten auf gekochtem Reis, gekochter Tapioka usw. Alkalien hemmen die Erzeugung der Farbe, während Säuren sie begünstigen.

Coupin und Friedel (11) fanden 1904 für Sterigmatocystis versicolor, daß dieser Pilz auf schwach saurem Nährboden ein gelbes Pigment ausscheidet, auf neutralem ein orangefarbenes, auf alkalischem ein rotes. Die alkoholische Pigmentlösung wird durch Säure gelb, durch Alkali rot; die Farbe der Sporen auf Raulins Lösung ist grün, bei Weglassung des Magnesium graurot, ebenso auf Kartoffeln und Mohrrüben.

Bessey (12) unternahm 1904 eine eingehende Untersuchung der Bedingungen für die Farbstoffbildung verschiedener Spezies von Pilzen, die nach ihrer Conidienbildung zu der Gattung Fusarium gehören, welche auf verschiedenen Substraten unter verschiedenen Bedingungen rote, violette, blaue, orange und gelbe Farben hervorgingen. Das rote Pigment zweier vom Sesamum isolierten Fusarien (a und b Pilz) und der Neocosmospora ist eine saure Verbindung, löslich in Alkohol und anderen Lösungsmitteln. Seine Salze sind violett gefärbt und unlöslich in den genannten Medien,

nur löslich in den Salzen einiger organischer Säuren. Festgestellt wurde, daß die unter dem Einfluß der Lichtwirkung durch dieselben Pilze gebildete Orangefarbe kein Lipochrom ist. Ihre nähere chemische Natur konnte nicht festgestellt werden. Der Farbstoff von Fusarium culmorum hat eine saure gelbe und eine rotviolette alkalische Modifikation. Die saure Form scheint eine schwache organische Säure zu sein und ist wenig löslich in Alkohol oder Wasser. Die alkalische löst sich in alkoholischen und wässerigen Solutionen von Alkalien. Die Bildung des roten oder violetten Pigments durch beide Sesampilze und Neocosmospora ist nicht abhängig von der Zusammensetzung der Kulturmedien. Farbloses Mycel aus einer sauren Kultur wird auch nach Uebertragung in eine sehr schwach alkalische Nährflüssigkeit farbig; Mycel, das von Anfang an in alkalischem Nährmedium sich entwickelt hat, bleibt dauernd farblos. Sehr starke Acidität des Nährbodens hemmt die Pigmentbildung. Sauerstoff ist für sie unerläßlich, doch wachsen die Pilze unter günstigen Bedingungen anaerob. Steigerung des osmotischen Druckes des Nährmediums macht die Bildung des roten Pigments unmöglich, desgleichen extrem hohe und niedere Temperaturen. Die Temperaturgrenzen fallen für die Pigmentbildung mit denen für das Wachstum fast zusammen. Gewisse giftige Stoffe hindern die Bildung des Pigments gänzlich. Andere erst in Konzentrationen, welche das Wachstum des Pilzes stark behindern. Die Orangefarbe wird von den Sesampilzen und Neocosmospora-Arten unter dem Einfluß des Lichtes auf allen Nährmedien hervorgebracht, wobei die Reaktion ohne Einfluß ist. Die wirksamen Strahlen sind die der blauen Spektrumhälfte. Freier Sauerstoff ist für die Farbbildung unerläßlich. Sie läßt sich durch hohen osmotischen Druck nicht unterdrücken. Der Farbstoff von Fusarium culmorum wird auf verschiedenen Nährböden gebildet. Auf alkalischen Medien entsteht die rotviolette Modifikation, auf sauren die gelbe. Schwache Alkalescens

und schwache Acidität hemmen die Farbstoffbildung nicht. Freier Sauerstoff ist für die Erzeugung des Farbstoffes unerläßlich.

Milburn (13) bearbeitete 1904 die Aenderung des Farbstoffes bei Hypocrea rufa und Aspergillus niger. Er fand, daß die Pigmentbildung in den Conidien von Hypocrea rufa sich durch steigenden osmotischen Druck und schließlich die Conidienbildung überhaupt unterdrücken läßt. Die Reaktion beeinflußt die Farbstoffbildung. Saure Reaktion ruft die Bildung grüner, alkalische gelber Conidien hervor. Gut ernährtes Mycel gibt im Dunkeln keine Fruktifikation, bei reichlicher Sauerstoffzufuhr oder bei schlechter Ernährung tritt Conidienbildung ein. Aehnlich verhält sich hinsichtlich der Sporen- und Farbstoffbildung Hypocrea gelatinosa. Aspergillus niger bildet außer dem bekannten schwarzen Sporenfarbstoff in seinem Mycel mehr oder minder reichlich gelbes Pigment, das auch in den schwarzen Sporen nachweisbar ist. Dieser gelbe Farbstoff ist sehr empfindlich gegen Belichtung und wird dadurch in einigen Stunden grau bis schwarz.

1909 unternahm Döpelt (14) die Untersuchung eines Penicillum, welches besonders auf Kohlehydraten einen blutroten Farbstoff und daneben ein mit gelber Farbe in Aether lösliches Pigment bildet. Organische Stickstoffquellen befördern bei künstlich unterdrücktem Wachstum die Bildung des roten Farbstoffes gegenüber anorganischen Stickstoffverbindungen. Fehlt einer oder mehrere Bestandteile der Mineralsalzlösungen, so wird Wachstum- und Pigmentbildung stark beeinträchtigt und hauptsächlich gelbes Pigment erzeugt. Nur bei saurer Reaktion und mäßiger Temperatur wird Farbstoff gebildet, da höhere Temperatur das Wachstum zu sehr befördert. Hoher osmotischer Druck hemmt zunächst die Farbstoffbildung, in geringem Maße das Wachstum. Die Farbstoffbildung ist unabhängig vom Licht, die Nachbarschaft fremder Pilze und Bakterien befördern sie

und können nicht ausreichende Nährböden durch Kontakt mit anderen Pilzen zu genügenden werden. Der Einfluß anderer Pilze ist abhängig und wird begünstigt vom diffusen Tageslicht.

Das Wachstum von Mikroorganismen auf Baumwolle wurde von Trotman (15) 1909 untersucht und die Verfärbung von Baumwollwaren durch einen Schimmelpilz nachgewiesen. Dieser rief in Reinkultur eine mattrosa Farbe der Baumwolle (sterilisiert + Stickstoffnahrung) hervor. Auf Gelatine wurde die Farbe langsam entwickelt. Gutes Wachstum fand auf Stärkemedien bei Anwesenheit von Spuren organischer Säure statt. In neutralen und alkalischen Medien langsames Wachstum. Als günstigste Bedingung für das Wachstum wurde Baumwolle, Stärke und etwas Weinsäure gefunden. Der Pilz, der von Trotman nicht näher bezeichnet wird, bildet farblose Lufthyphen, nach vierzehn Tagen Sporangien.

Epicoccum purpurascens (Ehrenberg).

Epicoccum, genus pulchellum, sed revisione analytica maxime eget — eine schöne Gattung, aber sie bedarf noch dringend einer eingehenden Untersuchung schreibt Saccardo (16) in seinem Sylloge fungorum. Fast ein Jahrhundert kennen heute die Mykologen Epicoccum purpurascens, welches schon 1818 Christian Gottfried Ehrenberg (17) im Berliner Tiergarten auf abgefallenen Pappelzweigen fand und als nova species einer von Link 1816 (18) entdeckten Gattung Epicoccum beschrieb. Trotz seiner so vielseitigen Verbreitung hat Epicoccum purpurascens sehr wenig Beachtung bei den Botanikern gefunden und daher mag es wohl auch kommen, daß über die Ernährungsphysiologie des Pilzes bis heute so gut wie nichts bekannt ist. Da es der Zweck nachfolgender Blätter sein soll, über eingehende Untersuchungen ernährungsphysiologischer Art zu berichten, die die Bedingungen der Farbstoffbildung ergründen wollen, so ist es notwendig, kurz anzuführen, was über Epicoccum purpurascens bisher bekannt ist. G. Lindau (19) gibt in Rabenhorsts Kryptogamenflora 1909 zuletzt eine zusammenfassende Darstellung über den Pilz, die ich noch weiter vervollständigen kann. G. Lindau (19) schreibt (pg. 594) folgendes: Wohl in keiner Gruppe der Hyphomyceten herrscht eine solche Verwirrung und ein solches Durcheinander der Formen wie bei den Tuberculariеae dematiae, zu denen die Formengattung Epicoccum und andere gehören. Aus diesem Grunde ist es zwingende Pflicht, über den von mir bearbeiteten Pilz die Angaben so vollständig wie möglich zu

machen. Den Namen Epicoccum hat der Pilz von seinen aufsitzenden Sporen erhalten.

Vorkommen des Pilzes: Auf Blättern, trockenen und toten Kräuterstengeln, Holz, z. B. Abies, Allium, Arundo, Asparagus, Bryonia, Carex, Desmodium, Dianthus, Erythrina, Gladiolus, Glyceria, Hedera, Juglans, Larix, Lycopodium, Nicotiana, Pinus, Populus, Quercus, Robinia, Saccharum, Sambucus, Saponaria, Sorghum, Spiraea, Umbelliferen, Zea, Zizania, an Früchten von Opuntia, an Tricholoma und an Schleimflüssen von Birken [G. Lindau (19)] vornehmlich in Begleitung von Cladosporium herbarum und Alternaria tenuis [Saccardo (16)]. P. Lindner (20) fand den Pilz auf dem Kleister abgerissener Plakate an Anschlagsäulen, auf Pappstücken, die auf Schuttplätzen einige Tage feucht gelegen hatten, im Gebirge und in Holzhandlungen auf abgeschälten Baumstämmen und Brettern in Form braunroter, punktgroßer Polster. K. Saito (21) fand bei zahlreichen Luftanalysen in Tokio Epicoccum purpurascens und stellte fest, daß es neben Cladosporium herbarum, Penicillium glaucum, Catenularia fuliginea n. sp. am häufigsten auftritt. Van Iterson (22) isolierte den Pilz gleichfalls aus der Luft. Die Geographische Verbreitung ist außerordentlich groß: Lindau (19) gibt für sie zu jeder Jahreszeit Deutschland, die österreichischen Alpenländer, Ungarn, Schweiz, Dänemark, Holland, Belgien, Italien, Frankreich, Portugal an, dazu kommt nach Saito (21) Japan. — Das Sporenlager stellt ein kleines kugliges Polster dar, 120—150 μ im Durchmesser, zu länglichen, 2—3 mm langen Räschen vereinigt, die auf länglichen, purpurnen Flecken aufsitzen. Die Konidien sind fast kugelig, zuerst gelblich, dann braun, netzig, deutlich warzigwabig und entstehen als kleine kuglige Anschwellung auf dichtgedrängt stehenden, kurzen, brüchigen, sich nach der Basis verjüngenden hyalinen Stielchen. Die Konidien haben einen Durchmesser von 15—22 μ (G. Lindau 19). Das Innere der Spore teilt sich nachträglich durch eine Anzahl Querwände. Jede

Teilzelle kann für sich auskeimen, die Teilungen sind zum Teil ziemlich regelmäßig (P. Lindner 23). Bei künstlichen Reinkulturen des Pilzes erhielt Kny und später auch P. Lindner (23) Sporenbildung auf Pflaumendekoktgelatine, während der Pilz auf Würzegelatine steril bleibt. Saito (21) fand, daß der Pilz auf zuckerhaltigem Fleischpeptonagar Konidien bildet, dagegen nicht auf Soyagelatine. (Soya ist ein aus Soyabohnen mit Hilfe von Aspergillus Wentii hergestellter Pflanzenextrakt mit starkem Kochsalzgehalt.) In Knopscher Nährlösung mit Rohrzucker kultiviert bildet der Pilz eine farblose, verdickte Dematium ähnliche Zellform (Saito 21). Bei eingehender Untersuchung mit stärkerer Vergrößerung trifft man häufig die Erscheinung an, daß im Innern der Fäden sich manchmal durch lange Strecken hindurch andere Fäden zeigen, welche ihre Entstehung von den Querwänden genommen haben (Lindner 24). Ueber die Physiologie des Pilzes ist fast nichts bekannt. G. van Iterson jr. (22) wies nach, daß Epicoccum purpurascens zu den Schimmelpilzen gehört, die bei aerobem Wachstum Zellulose lösen. Der Pilz wurde auf zwei sterile Scheiben schwedischen Filtrierpapieres gebracht und mit einer Nährlösung (auf 100 g Leitungswasser 0,05 g Ammoniumnitrat + 0,05 g Mono Kaliumphosphat) unter Feuchthaltung des Papieres bei 24 ° C kultiviert. Van Iterson konstatierte, daß Epicoccum purpurascens unter den von ihm untersuchten Pilzen zu den kräftigsten Zellulase bildnern gehört. In einer Arbeit von Saida (25) „über die Assimilation von Stickstoff aus der Luft durch Schimmelpilze“ kommt ein Endococcus purpurascens vor. Da es sich hier augenscheinlich um einen Druckfehler handelt, der in der einschlägigen Literatur (auch im Lafar [26] etc.) aufgenommen ist, so ist es notwendig, an dieser Stelle darauf hinzuweisen, daß erstens kein Schimmelpilz Endococcus purpurascens existiert (Saccardo, Engler-Prantl) und daß zweitens unter den zahlreichen Flechtenparasiten mit der Bezeichnung Endococcus, eine Spezies purpurascens

nicht zu finden ist (vergl. Flora 1874). Es ist demnach in der Saidaschen Arbeit für Endococcus purpurascens offenbar Epicoccum purpurascens zu setzen. Saida fand bei Rohrzuckerlösung + Zugabe von Spuren Stickstoffnahrung (!) eine Zunahme von 1 mg Stickstoff. Die üppige Farbstoffproduktion veranlaßte P. Lindner (20) sich eingehender damit zu befassen. Lindner stapelte zur Gewinnung von möglichst viel Farbstoff Plattenkultur auf Plattenkultur in einer geräumigen, feuchten Kammer. Auf diesen Plattenkulturen, die in der Mitte der Pflaumendekoktgelatinefläche geimpft wurden, stellte sich immer an der Glasseite des Gelatinekuchens eine intensive Färbung ein, während die Lufthyphen meist rein weiß, mitunter gelb bis gelblich rot gefärbt waren. Ein alkoholischer Auszug der Kulturen wurde von Prof. Tschirch, Bern, spektroskopisch untersucht. Nach dem Angströmschen Normalspektrum in Milliontel Wellenlängen lag bei 468—448 ein Bandmaximum der Dunkelheit mit Endabsorbtion des Blau und Violett. Das Band ist nur in mittlerer Schichtendicke sichtbar. Alte alkoholische Extrakte von Plattenkulturen gaben Bandspuren zwischen 494 bis 461 und Endabsorbtion. Der Wechsel in der Färbung von weiß zu rot und gelb wird von Lindner (20) so gedeutet, daß die einzelnen Zellen des Pilzfadens sich in ihrer chemischen Arbeit ebenso verschieden verhalten können, wie die Zellen gefärbter Blumenblätter. Weiter beobachtete Lindner (20), daß die Pigmentbildung auf Würzegelatine nachläßt. Van Iterson (22) berichtet von purpurroter Färbung auf Filtrierpapierkulturen.

Eigene Untersuchungen.

Das Material.

Im August 1909 fand P. Lindner in Schöneck bei Beckenried, am Südufer der Vierwaldstädter Sees, auf abgeschälten Baumstämmen Sporenpolster von Epicoccum purpurascens. Diese sandte er unter einer Briefmarke auf einer Postkarte an das Institut für Gärungsgewerbe, wo die Sporen auf Pflaumendekokt- und Würzegelatine ausgesät und dann der Pilz in Reinkultur erhalten wurde. Bei meinen Arbeiten mit verschiedenen Schimmelpilzen fiel es mir auf, daß Epicoccum purpurascens in seiner Pigmentbildung sehr wechselte, auf Pflaumendektoktgelatine war die Färbung wundervoll rot, auf Würzegelatine trat diese Färbung nur selten auf und in manchen Nährlösungen wuchs der Pilz auch an der Oberfläche farblos. Um exaktes Ausgangsmaterial zu erhalten, erschien es notwendig, von einer rein gezüchteten Spore aus alle Versuche anzustellen. Die Sporenbildung bei Epicoccum purpurascens bleibt oft überhaupt aus. Es sei hier auf das oben Gesagte verwiesen, daß Kny und Lindner auf Pflaumendekoktgelatine und Saito auf zuckerhaltigem Fleischpeptonagar Sporen erhielten. Auf Pflaumendekoktgelatine habe ich Sporen erhalten. Die von mir isolierte Spore erhielt ich aus folgender Kultur: Ein steriler Gipsblock wurde mit einer sterilen Lösung, die auf 10 ccm Leitungswasser 1 g Asparagin und 0,1 g K_2HPO_4 enthielt, in einer Doppelschale übergossen, so daß die überschüssige Flüssigkeit beständig den Gipsblock benetzte, und dieser durch Ueberspülen feucht gehalten werden konnte. Nach 4—6 Wochen

zeigten sich auf dem roten Mycel braunrote Punkte, die sich als Sporenlager von Epicoccum purpurascens erwiesen. Die Größe der Einzelspore wurde gemessen und zu durchschnittlich 16—20 μ bestimmt, was der bei Lindau und Saccardo für Epicoccum purpurascens Ehrenberg angegebenen Sporengröße entspricht. Mit Hilfe der Lindnerschen Tröpfchenkultur wurde aus einem Sporenhäufchen eine Einzelspore isoliert. Da diese Methode, die heute in der Praxis der Reinkultur von Hefen und Schimmelpilzen eine wichtige Rolle spielt und insbesondere für die biologische Analyse von Vegetationsgemischen von eminenter Bedeutung ist, noch nicht in alle einschlägigen Werke aufgenommen ist, sei es mir verstattet, in Kürze auf sie einzugehen. Die Reinzucht durch Tröpfchenkultur (Federstrichkultur) besteht darin, daß Sporenmaterial in einer Nährflüssigkeit fein verteilt wird und diese vermittels einer sterilen Feder auf ein steriles Deckgläschen, welches etwas angefettet sein muß, in kleinen Strichen geschrieben wird. Das Deckgläschen wird vor dem Beschreiben auf einem sterilen, hohlen Objektträger mit einem Vaselinering befestigt, zum Anlegen der Kultur abgehoben und dann wieder durch den Vaselinering angeklebt. Da mir nur wenig, also sehr wertvolles Sporenmaterial von Epicoccum purpurascens zur Verfügung stand, modifizierte ich die Lindnersche Methode wie folgt. Mit steriler Bierwürze wurde auf einem Deckgläschen eine Federstrichkultur angelegt. Dann wurde mit einer trockenen sterilen Feder von einem Sporenhäufchen Material entnommen und mit dieser Feder auf die einzelnen schon vorher angelegten Würzefederstriche getupft. Durch unmittelbar folgende mikroskopische Untersuchung überzeugte ich mich, daß es mir bei einem Tröpfchen (unter etwa 6 derartigen Versuchen) gelungen war, eine Einzelspore zu isolieren. Das Auskeimen der Spore wurde nach 24 Stunden festgestellt und nach 48 Stunden wurde mit einer sterilen Feder Mycel von der isolierten Spore auf Nähr-

flüssigkeit in Erlenmeyer-Kölbchen übergeimpft. Von den Erlenmeyer-Kölbchen aus wurden dann Lindnersche Pilzgläser geimpft und mit minimalen in diesen gewachsenen Mycelstückchen alle weiteren Versuche angestellt.

Kulturgefäße.

Es kamen neben 50 und 100 ccm Erlenmeyer-Kölbchen, Reagensgläsern, Petrischalen vor allen Dingen Lindnersche Pilzgläser zur Verwendung. Diese, eine Erfindung von Prof. Paul Lindner, DRP. Nr. 211 037, sind oben geschlossene, rund gewölbte, unten mit einer Rinne versehene Zylinder, bei denen der Hals unten erweitert als Fuß dient, von folgender Form (vgl. auch d. Titelbild):

Diese Gläser werden durch einen Wattepropfen verschlossen und sterilisiert. Die sterile, flüssige Nährgelatine wird unter den üblichen Vorsichtsmaßregeln hineingegossen und durch Rollen auf einem Eisblock zum Erstarren gebracht. Der Gebrauch der Lindnerschen Pilzgläser bietet große Vorteile für die Kultur der Schimmelpilze.

1. Bequemes Impfen durch den Hals bei möglichst geringer Infektionsmöglichkeit;

2. die Möglichkeit, beliebig von allen Seiten das Wachstum des Pilzes zu kontrollieren;

3. der Pilz kann sich unter guten Ernährungsbedingungen zu einer Riesenkolonie entwickeln und ist dann häufig im wahrsten Sinne des Wortes eine Prachtkultur. Es wird

bei jeder Versuchsanordnung die Form des Kulturgefäßes und die Art der Ernährung angegeben werden.

Arbeitsplan.

Als Hauptaufgabe dieser Arbeit wurde schon oben die Untersuchung der Bedingungen für die Pigmentbildung bei Epicoccum purpurascens bezeichnet. Es lag nahe, den Einfluß folgender Faktoren einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen:

1. der Nährsalze,
2. der Kohlehydrate,
3. der Stickstoffquellen,
4. der Reaktion der Nährlösung,
5. des osmotischen Druckes,
6. der Temperatur,
7. des Lichtes,
8. verschiedener Gase,
9. der Reizwirkung von Bakterien.

1. Der Einfluß der Nährsalze.

Zu exakten Untersuchungen über den Einfluß von Nährsalzen auf die Entwicklung von Mikroorganismen, wie Bakterien und niederen Pilzen, ist es seit den klassisch zu nennenden Arbeiten von W. Benecke (27) notwendig, derartige Versuche unter äußersten Vorsichtsmaßregeln anzustellen, weil man sonst ungenaue, sich widersprechende Resultate erhält. Gefäße aus Quarz, unter besonderen Kautelen dreifach überdestilliertes Wasser und durch mehrmaliges Umkristallisieren aufs Sorgfältigste gereinigte Mineralsalze sind für derartige Versuche unerläßlich. Da es sich bei meinen Versuchen nicht um das Mineralsalzbedürfnis des Pilzes, sondern, wie sich bald zeigte, mehr um eine Frage der Konzentration gewisser Stoffe handelte, wurde von einer Versuchsanstellung in erwähnter Richtung abgesehen. Rohversuche ergaben, daß Kalium und auch Phosphorsäure ohne Einfluß auf die Farbstoffbildung sind, dagegen Magnesium in einer gewissen Konzentration notwendig zur Pigmentbildung ist. Weiter zeigte sich bei diesen ersten Versuchsreihen, daß die Art der Stickstoffnahrung von Einfluß auf die Farbstoffbildung sein muß, da Ammonsulfatkulturen keine, dagegen Kaliumnitratkulturen beträchtliche Pigmentbildung zeigten. Diese Versuche gaben also das eigentliche Leitmotiv zu der Arbeit.

Versuchsanstellung:

Das erste Erfordernis zur Anstellung derartiger Versuche

ist eine möglichst einfache Nährlösung. Von der Benutzung komplizierter Nährlösungen, wie der Raulinschen oder Knopschen wurde abgesehen. Diese werden zwar zur Kultur höherer Pflanzen häufig angewandt, sind aber für niedere Pilze und Bakterien entschieden zu umständlich. Benecke (27) verwandte zur Feststellung des Mineralsalzbedarfes bei verschiedenen Bakterien eine Nährlösung, die

Asparagin	0,25 %
Magnesiumphosphat	0,05 %
Kaliumsulfat	0,02 % enthielt.

H. Pringsheim (28) brachte für Schimmelpilze mit Erfolg folgende Nährlösung zur Anwendung:

Zucker + { Ammonsulfat 0,3 % ; Mono Kaliumphosphat 0,05 % ; Magnesiumsulfat 0,01 % }

Dieser Lösung wurden noch Spuren von NaCl und $FeSO_4$ zugesetzt. Von diesen beiden Lösungen, die im Stickstoff- und Nährsalzgehalt fast übereinstimmen, wurde die von Pringsheim gegebene gewählt unter Weglassung der Zugabe von Spuren Eisensulfat und Chlornatrium, da Vorversuche die Zugabe dieser Salze als unnötig zur Pigmentbildung gezeigt hatten. Als Kohlehydratquelle wurde 2 % Dextrose beigegeben. Die Versuche wurden in 100 ccm Erlenmeyerkölbchen mit 50 ccm Nährlösung angestellt, die Lösung durch kurzes Aufkochen sterilisiert. Die Reaktion war bei den $KH_2\ PO_4$ enthaltenden Nährlösungen schwach sauer.

a. Prüfung durch Weglassen von Kationen aus der Nährlösung. Kohlehydrat = 2 % Glukose:

1. 0,3 % $(NH_4)_2\ SO_4$ + 0,05 % $KH_2\ PO_4$ + 0,01 % Mg SO_5. Vollständige Lösung mit $(NH_4)_2\ SO_4$ als N Quelle.

2. 0,3 % $(NH_4)_2\ SO_4$ + 0,05 % $KH_2\ PO_4$. Ohne Magnesium. (S. folgende Blätter.)

3. 0,3 % $(NH_4)_2$ HPO_4 + 0,01 % Mg SO_4. Ohne Kalium.

4. 0,05 % KH_2 PO_4 + 0,01 % Mg SO_4. Ohne Ammonium.

5. 0,3 % KNO_3 + 0,05 % KH_2 PO_4 + 0,01 % Mg SO_4. Vollständige Lösung mit KNO_3 als N Quelle.

6. 0,3 % KNO_3 + 0,05 % KH_2 PO_4 + 0,01 % K_2 SO_4. Ohne Magnesium (s. u.).

7. 0,3 % Mg NO_3 + 0,05 % Mg HPO_4 + 0,01 % Mg SO_4. Ohne Kalium.

b. Prüfung durch Weglassen von Anionen:

Bei diesen Versuchen wurde außer den PO_4, SO_4, NO_3 noch der Cl Säurerest geprüft. Kohlehydrat = 2 % Glukose.

1. 0,3 % NH_4 NO_3 + 0,05 % KH_2 PO_4 + 0,01 % Mg SO_4 + 0,01 % K Cl. Lösung mit allen Säureresten.

2. 0,03 % NH_4Cl + 0,05 % KCl + 0,01 % Mg Cl_2. Ohne PO_4, SO_4 NO_3.

3. 0,3 % $(NH_4)_2$ HPO_4 + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,01 % Mg HPO_4. Ohne Cl, SO_4 NO_3.

4. 0,3 % (NH_4) NO_3 + 0,05 % KNO_3 + 0,01 % Mg NO_3. Ohne PO_4, SO_4, Cl.

5. 0,3 % $(NH_4)_2$ SO_4 + 0,05 % K_2SO_4 + 0,01 % Mg SO_4. Ohne PO_4, NO_3, Cl.

Nach 15 Tagen ergab: bestes Wachstum a 5; gutes Wachstum a 1; a 2; a 3; a 6; a 7; b 1; b 3; schlechtes Wachstum b 2; b 4; b 5; fast gänzliches Ausbleiben a 4; Pigmentbildung trat ein bei a 5; a 7; b 4; Spurenhaft bei b 1. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Pigment ausschließlich auf Nährlösungen, die das NO_3 Jon und Mg Jon enthielten, hervorgebracht wird. Daß Magnesium für die Bildung von Pigmenten bei Bakterien und Pilzen notwendig sei, wiesen viele Forscher nach. Interessant in dieser Richtung ist eine

Arbeit von Samkow (29) über die Physiologie des Bacillus prodigiosus. Samkow zeigte, daß in Nährlösungen ohne Magnesium kein Pigment gebildet wurde. Weiter wies er nach, daß in dem durch Alkohol extrahierten Pigment, das man durch mehrmaliges Abdunsten der ätherischen Lösung reinigen kann, nach Veraschen kein Magnesium nachzuweisen sei. Das Magnesium bildet für den B. prodigiosus keinen Bestandteil des Pigmentes, ist aber notwendig für die physiologische Funktion des Protoplasmas, welches das Pigment bildet. Weiter sei hier auf eine grundlegende Arbeit von W. Benecke (27) verwiesen, in welcher gezeigt wird, daß bisher noch kein Pilz, überhaupt keine Pflanze gefunden ist, die ohne Magnesium wachsen kann. Ebendort macht Benecke auf den Einfluß des Magnesiumgehaltes verschiedener Glassorten aufmerksam. Ich möchte mich hier zu der Annahme erklären, daß dort, wo ein Einfluß von Magnesium auf Aenderungen in der Pigmentbildung von Bakterien und Pilzen beobachtet wurde, dies lediglich eine Folge der Konzentration der gelösten Magnesiumverbindung ist. Es wäre demnach in allen Versuchen früherer Forscher, die nicht in Quarzkölbchen und unter sorgfältigster Beobachtung aller Vorsichtsmaßregeln angestellt wurden, für Magnesiumfrei Magnesiumarm zu setzen. Coupin und Friedel (11) wiesen nach, daß Aspergillus versicolor in einer magnesiumfreien Raulinschen Nährlösung graurosafarbige Konidien statt der sonst normalen grünfarbigen bildete. Kossowisz (30) fand, daß Magnesiumsalze von tiefgreifendem Einfluß auf die Farbstoffbildung durch gewisse Saccharomyceten sind. In einer Nährlösung, die 5 % Rohrzucker, 0,4 % KCl, 0,4 % Mg SO_4, 0,04 % Ca_2H_2 $(PO_4)_2$ und 0,4 % $(NH_4)_2$ H PO_4 enthielt, bilden Saccharomyces ellipsoideus I und Saccharomyces cerevisiae I einen fleischroten und die Spiritushefe Rasse II der Berliner Station einen rötlichgelben Farbstoff, während S. Pastorianus I, II und III, S. ellipsoideus II, S. exiguus, S. anomalus,

S. membranefaciens, Carlsberg Unterhefe Nr. 2 und Frohberghefe keinen Farbstoff bilden. Kossowisz fand weiter, daß die Pigmentbildung bei 0,04 % eintritt, mit steigendem Gehalt an Magnesiumsulfat wächst und am schönsten wird, wenn die Nährlösung gesättigt ist. Auf die Arbeit von Kossowisz hin erschien es zweckmäßig, den Einfluß von Mg SO_4 in verschiedenen Konzentrationen auf die Pigmentbildung von Epicoccum purpurascens zu prüfen.

Es wurde die Zusammensetzung der Nährlösung gewählt, die im Vorversuch für die Pigmentbildung am günstigsten gefunden wurde: 5 % Dextrose, 0,3 % K NO_3, 0,05 % K H_2 PO_4, 50 ccm Nährlösung in 100 ccm fassenden Erlenmeyern.

Konzentration des Mg.	0,2	0,4	0,6	0,8	1	5	10%	Magnesiumsulfat + 7Aqua
Eintreten von Färbung nach Tagen	6	6	5	8	10	Spuren nach 14 Tagen		

Die absolute Grenze der für die Farbstoffbildung notwendigen Konzentration an Mg SO_4 wurde nicht festgestellt, da schon der Zusatz von 0,01 % Mg SO_4 + 7 aqua ausreichte, um reichlich Pigment zu bilden, andererseits es schon genügte, mit einer Platinnadel, die nicht sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült war, genügende Mengen Magnesium in magnesiumfreie Kulturen zu bringen, um Pigment zu erzeugen. Der Einfluß des Magnesiums auf die Pigmentbildung bei Epicoccum purpurascens ist also lediglich eine Frage der Konzentration. Ueber den Einfluß der Nitrate und Ammonsalze wird unter dem Kapitel „Einfluß der Stickstoffnahrung“ näher einzugehen sein.

2. Die Kohlehydrate.

Wenn es sich in diesem Kapitel darum handelt, den Einfluß von Kohlehydraten auf die Pigmentbildung zu untersuchen, so sei auf die Notwendigkeit aufmerksam gemacht, bei diesen Versuchen von einer Nährsalzlösung auszugehen, die das Wachstum und die Pigmentbildung optimal beeinflußt. Wie aus obigem Versuche hervorging, wurde am besten Farbstoff erhalten in einer Lösung mit 0,3 % KNO_3, 0,05 % K H_2 PO_4 und 0,01 % Mg SO_4. Ich behielt deshalb für die folgenden Versuche diese Grundnährlösung mit Nitrat als Stickstoffquelle bei. Ich möchte erwähnen, daß ich mit Ammonsulfat als Stickstoffquelle denselben Versuch durchführte, daß es jedoch unmöglich war, durch Aenderung der Kohlehydrate Farbstoffbildung zu erhalten.

Versuchsanordnung.

Die Lösungen enthielten 2 % des Kohlehydrates, 0,3 % K NO_3, 0,05 % K H_2 PO_4, 0,01 % Mg SO_4 und wurden in Reagensgläsern angesetzt. Die Farbstoffbildung zeigt sich nur, wenn das zuerst submers wachsende Pilzmycel die Oberfläche erreicht.

Kohlenstoffquelle:	Eintreten des Farbstoffes:
Pentosen:	
Xylose	nach 20 Tagen Pigment
Arabinose	„ 18 „ „

Hexosen:	
Dextrose	nach 18 Tagen Pigment
Laevulose	„ 18 „ „
Galaktose	„ 18 „ „
Disaccharide:	
Rohrzucker	nach 4 Wochen keine Pigmentbildg.
Maltose	nach 4 Tagen Pigment
Milchzucker	„ 20 „ „
Trisaccharid:	
Raffinose	„ 18 „ „
Polysaccharide:	
Stärke	„ 3 „ „
Inulin	nach 4 Wochen keine Pigmentbildung.
Cellulose (Petrischale)	nach 5 Tagen Pigment
Dextrin	nach 4 Wochen kein Pigment
Diverse:	
Amygdalin	„ 4 Tagen Pigment
α Methylglukosid	„ 18 „ „
β Methylglukosid	„ 8 „ „
Mehrwertige Alkohole:	
Glycerin	nach 4 Wochen kein Pigment
Erythrit	„ „ „
Dulzit	„ „ „
Mannit	„ „ „

Es ist zu betonen, daß bei allen Versuchen Wachstum eintrat. Dies war sehr schwach bei Rohrzucker, Dextrin und Inulin. Auch alle sonstigen Versuche, die auf Wachstum mit Rohrzucker angestellt wurden, fielen sehr schwach im Wachstum aus. Vermutlich besitzt Epicoccum purpurascens keine Invertase, da sowohl auf Dextrose wie Laevulose, den Bestandteilen des Invertzuckers, Pigment gebildet wird und üppiges Wachstum eintritt. Maltose und Stärke sind bei weitem die günstigsten Kohlehydrate für die Pigmentbildung, ebenso Cellulose, was, wie ich oben anführte, schon

van Iterson (22) fand, indem er ebenfalls dem Pilz Nitrat als Stickstoffnahrung zuführte. Auffallend ist, daß durch keinen der angewandten mehrwertigen Alkohole: Glycerin (III wertig) Erythrit, (vierwertig), Dulzit und Mannit, (sechswertig), Pigmentbildung erreicht werden konnte. Da diese mehrwertigen Alkohole auf einer tieferen Oxydationsstufe als die Aldosen und Ketosen stehen und die charakteristische Gruppe der Zuckerarten — C.HOH.CO — nicht haben, so ist zu vermuten, daß diese auf die Pigmentbildung von Einfluß ist. Daß auf Inulin, Rohrzucker, Dextrin kein Farbstoff gebildet wird, könnte darin seine Erklärung finden, daß dem Pilz die zur Spaltung dieser Polyosen in Monosen notwendigen Enzyme fehlen. Da bei diesen 3 Versuchen spurenhaftes Wachstum eintrat, so ist es nur den geringen Verunreinigungen dieser Polyosen, beim Rohrzucker etwa einer in kleinem Maßstabe eingetretenen Inversion zuzuschreiben. Interessant ist das Auftreten von Pigment bei den beiden Methyl-Glukosiden und Amygdalin. Der Pilz spaltet also die Glukoside = α und β Methylglukosid[1] und das Amygdalin und gewinnt durch das dann erhaltene Monosaccharid die Fähigkeit, Pigment zu bilden. Es steht weiterhin zu vermuten, daß Epicoccum sowohl Emulsin, wie Maltase bildet, da Emulsin die Fähigkeit hat, von den beiden Methylglukosiden nur das β-Methylglukosid zu spalten und das durch Emulsin in Dextrose, Benzaldehyd und Blausäure spaltbare Amygdalin ebenso dem Pilz als pigmentbildendes Kohlehydrat dienen kann, wie Glukose und andere. Es sei darauf hingewiesen, daß es sich in diesen Versuchen nicht um eine definitive Feststellung der Bildung von den erwähnten Enzymen bei Epicoccum purpurascens handeln kann. Ihre Anwesenheit ist aber durch das Eintreten von Pigmentbildung höchst wahrscheinlich, so daß wir in der Farbstoffbildung

1. Es sei mir gestattet, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. O. Emmerling meinen ergebensten Dank für das mir liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellte β-Methylglukosid zu sagen.

des Pilzes eine Art Enzymreagens erhalten haben. Zur definitiven Feststellung dieser Enzyme wäre es notwendig, quantitative Versuche vermittelst E. Fischers Osazonprobe (31) zu machen.

Es schien weiter wissenswert zu untersuchen, ob durch Aenderung der Lösung an Zuckerkonzentration eine zeitliche Aenderung im Eintreten des Pigmentes herbeigeführt wird. Der Versuch zeigt, daß in Dextroselösung das Optimum der Pigmentbildung bei einem Gehalt von 5—10 % Glukose liegt. Bei einer Konzentration von 50 % — 60 % Glukose unterblieb die Farbstoffbildung vollständig, eine Erscheinung, die, wie später rechnerisch nachgewiesen wird, auf den hohen osmotischen Druck zurückzuführen ist.

Versuchsanordnung: 0,3 % KNO_3 + 0,05 % KH_2PO_4 + 0,01 % $MgSO_4$.

Zeit des ersten Erscheinens von Pigment bei verschiedener Konzentration des Dextrosegehaltes.

Dextrose %	2	5	10	15	20	30	40	50	60
nach Tagen	18	5	5	8	9	19	20	Wachstum ohne Pigmentbildung	

Mit organischen Säuren (neutralisiert) und ihren Salzen wurden ebenfalls bei verschiedener Stickstoffnahrung, wie KNO_3 und $(NH_4)_2SO_4$ Versuche angestellt, die aber nur negative Resultate lieferten. Geprüft wurde Natriumacetat, Calciumlactat, saures apfelsaures Calcium, Weinsäure, Bernsteinsäure (letztere beide durch Soda neutralisiert) in 2 %iger Konzentration. Das Wachstum war bei allen Versuchen schlecht ohne Pigmentbildung. Spurenhaft trat diese einmal bei dem apfelsauren Salz auf.

Der Nachweis der Diastase.

Das gute Wachstum auf Stärkelösung ließ vermuten, daß Epicoccum purpurascens reichlich Diastase produziert. Während andere Enzyme, worauf oben hingewiesen wurde, nur mit E. Fischers (31) Osazonprobe exakt nachzuweisen sind, gelingt es relativ ohne Schwierigkeit, die Diastasebildung sicher festzustellen. Der Nachweis der anderen Enzyme war in dieser Arbeit von geringerem Interesse, der der Diastase insofern von Wichtigkeit, als der zur Farbstoffgewinnung später angegebene Weg darauf beruht, den Pilz auf Reis zu züchten. Die Diastasebildung konnte, wie folgender Versuch zeigt, einwandfrei nachgewiesen werden.

Versuchsanordnung: Der Pilz wurde auf einer mit sterilem Reis gefüllten Glasschale mit Glasdeckel vom Durchmesser = 25 ccm gezüchtet. Nach zwei Monaten hatte er eine dicke Myceldecke gebildet, die den Reis fast vollkommen aufgezehrt hatte. Das Mycel wurde mit Sand fein zerrieben und 24 Stunden mit destilliertem Wasser unter Zusatz von Toluol extrahiert. Der abfiltrierte, schwach bräunlich gefärbte Auszug wurde mit 98 %igem Alkohol versetzt, worauf ein weißlicher Niederschlag entstand. Nachdem der Niederschlag sich abgesetzt hatte, wurde dekantiert und noch einmal mit Wasser gelöst und durch Alkohol gefällt. Die wässrige Lösung des zweiten Niederschlages wurde mit 10 ccm Stärkelösung, 2 % lösliche Stärke enthaltend, versetzt und in zwei gleichen Portionen in 2 Reagensgläser gegeben.

Reagensglas a wurde aufgekocht (Kontrolle), Reagensglas b nicht; beide wurden unter Zusatz von viel Toluol während 24 Stunden im Thermostaten bei 45° C gehalten. Nach 24 Stunden war das äußere Bild, daß die Flüssigkeit in b klarer war als in der aufgekochten Probe a. Zunächst wurden a und b kleine Proben entnommen und mit Jod-

jodkaliumlösung zusammengebracht. a zeigte die blaue Stärkereaktion, b die schwach rote Färbung von Erythrodextrin. Mit Fehlingscher Lösung versetzt, ergab a keine, b eine starke Reaktion von reduziertem Kupfer. Die Bildung von Diastase durch Epicoccum purpurascens ist somit einwandfrei nachgewiesen.

3. Der Einfluß der Stickstoffnahrung.

Um den Einfluß der Stickstoffnahrung auf die Entwicklung eines Pilzes zu studieren, ist es wohl zweckmäßig, in Anlehnung an Beijerink (32) und Jost (33) so zu verfahren, daß man die verschiedenartigen Ansprüche an die Stickstoffnahrung in getrennten Gruppen betrachtet. Dies sind die Gruppen der 1. Nitrogen Pilze, welche freien Stickstoff aufnehmen und binden = Stickstoff-Prototrophie. 2. Ammon-Nitrit-Nitratpilze, die den Stickstoff anorganischen Nährquellen entnehmen und bei denen die Mehrzahl ihn sowohl aus anorganischen wie organischen Stickstoffverbindungen benutzen kann = obligate und fakultative Stickstoff-Autotrophie. 3. Amid- und Peptonpilze, die auf organische Stickstoffquellen, wie Aminoverbindungen, Pepton, Albumosen angewiesen sind = Stickstoff-Heterotrophie bezw. Stickstoff-Paratrophie bei Parasiten.

Der Luftstickstoff.

Bei meinen Beobachtungen über den Einfluß der Ernährungsbedingungen auf die Pigmentbildung bei Epicoccum purpurascens lag infolge der in der Einleitung erwähnten Saidaschen Arbeit (25) die Notwendigkeit vor, nachzuprüfen, ob der Pilz ohne jede Stickstoffnahrung imstande ist, Pigment zu bilden. Es war Saida nicht gelungen, den Pilz in einer Rohrzuckerlösung mit Nährsalzen zum Wachstum zu

bringen. Erst nach Zugabe von Spuren Pepton wuchs der Pilz, wobei durch die Kjeldahl-Methode eine Zunahme von 1 mg Stickstoff ermittelt wurde. Zunächst sei darauf hingewiesen, daß Epicoccum purpurascens auf Rohrzucker sehr schlecht gedeiht, vermutlich da es keine Invertase bildet, worauf ich bei meinen obigen Untersuchungen hinwies. Trotzdem wurde der Versuch auch mit Rohrzuckerlösung angestellt, um die Saidaschen Beobachtungen nachzuprüfen.

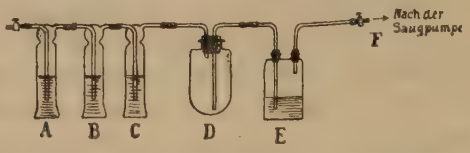
Es kamen folgende Nährlösungen zur Anwendung: Lösungen, die 10 % Zucker a) Dextrose, b) Rohrzucker + 0,05 % K H_2 PO_4 + 0,01 % Mg SO_3 in destilliertem Wasser enthielten. Die beiden reinsten Zucker (reinster Traubenzucker von Kahlbaum und Rohrzucker aus dem Institut für Zuckerindustrie* erwiesen sich bei der Lassaigneschen Probe als stickstofffrei. Da schon bei den Versuchen über den Einfluß der Nährsalze auf die Pigmentbildung beobachtet wurde, daß Epicoccum purpurascens ohne Stickstoffquelle sehr wenig wächst, wurde bei diesem Versuch, um dem Pilz vielleicht durch aerobe Bedingungen das Wachstum zu ermöglichen, wie folgt verfahren. In Lindnersche Pilzgläser wurden 2 Scheiben schwedischen Filtrierpapieres gebracht und mit diesen zusammen wurden die Zylinder sterilisiert.

In diese wurde die sterile Nährlösung gegossen und dann eine Spur Pilzmycel auf das Papier geimpft. Diese Versuchsanordnung bietet deshalb Vorteile, weil dem Pilz durch capillares Aufsteigen der Lösung im Filtrierpapier beständig Nahrung zugeführt wird, er also nicht gezwungen wird, submers zu wachsen, sondern reichliche Zufuhr von Luft erhält. Die Pilz-Gläser wurden sofort nach der Impfung

---

* Es ist mir eine angenehme Pflicht an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Herzfeld meinen ergebensten Dank für den mir gütigst zur Verfügung gestellten reinen Rohrzucker zu sagen.

in einen Apparat folgender Anordnung eingereiht unter Beobachtung der sorgfältigsten Sterilhaltung.



A, B, C sind Waschflaschen, A mit Wasser, B mit Kalilauge (1:1) und C mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllt, um die Luft von den in ihr vorhandenen Stickstoffverbindungen zu reinigen. D ist das Lindnersche Pilzglas, E eine Sicherheitsflasche und F die Wasserstrahlsaugpumpe, die einen langsamen Luftstrom durch den Apparat reguliert. Nach einem Monat zeigte sich bei minimalem Wachstum keine Pigmentbildung. Ob der Pilz tatsächlich imstande ist, den Luftstickstoff zu verarbeiten, wagt Verfasser nicht zu entscheiden. Da es sich hier nur um den Versuch handelte, ob auf die Pigmentbildung der Luftstickstoff von Einfluß sei, konnte naturgemäß der von Saida (25) beschriebene Weg „eine Spur Pepton beizugeben" nicht eingeschlagen werden!

Erwähnenswert ist, daß über die Luft-Stickstoffassimilation durch Schimmelpilze durchaus keine Uebereinstimmung herrscht, was aus den Angaben von Koch (34) im „Kreislauf des Stickstoffes" und bei der reichlich angeführten Literatur von H. Zikes (35) in seiner Arbeit über die Luftstickstoff assimilierende Hefe: Torula Wiesneri zu ersehen ist.

Der Stickstoff in Ammon, Nitrit und Nitratverbindungen.

Da bei Epicoccum purpurascens zweifellos fakultative Stickstoffautotrophie vorhanden ist, der Pilz also fähig ist, seine Stickstoffnahrung sowohl anorganischen wie organischen Stickstoffverbindungen zu entnehmen, so seien zunächst

die anorganischen Stickstoffverbindungen und ihr Einfluß auf die Pigmentbildung besprochen. Allerdings hat besonders die anorganische Stickstoffnahrung einen wesentlichen ernährungs-physiologischen Faktor im Gefolge: die Reaktion. Es erscheint deshalb zweckmäßig, diese bei den einzelnen Nährstoffen gleichzeitig zu besprechen und dann nur nochmals kurz den Einfluß der Reaktion auf die Pigmentbildung zusammenfassend zu behandeln. Es ist eine vielerörterte Frage, ob unter den anorganischen Stickstoffquellen Ammon oder Nitrat vorgezogen wird. Daß dieselben von tief eingreifender und stark unterschiedlicher Bedeutung für die Biochemie eines Pilzes sein können, soll versucht werden im folgenden bei Epicoccum purpurascens nachzuweisen. W. Benecke (36) schreibt im Lafar im Kapitel über die Stickstoffquellen für Eumyceten (p. 402): „Es bleibt wohl noch zu untersuchen, inwieweit die allmählich eintretende Aenderung der Reaktion der Nährlösung hierbei mitwirkt. Denn großenteils hängt die Eignung der einen oder der anderen Verbindungsform gar nicht mit der Oxydationsstufe des Stickstoffes, sondern mit der Tatsache zusammen, daß bei Darbietung von Nitraten im allgemeinen die Nährlösung allmählich alkalisch, bei Darbietung von Ammoniumsalzen, etwa dem Sulfat oder Chlorid, aber sauer wird, und daß es im ersten Falle davon abhängt, ob der Pilz durch regulatorische Bildung von Säure der Alkalescens entgegenzuarbeiten vermag, und im letzteren Falle davon, wieviel Säure er verträgt.“ Aus diesen Zeilen ist ersichtlich, daß man schlechterdings bei Betrachtungen der anorganischen Stickstoffnahrung die Reaktion nicht unbeachtet lassen darf. Von den Ammoniumsalzen wurde das Sulfat gewählt. In einer Arbeit von G. Ritter (37) wurde gezeigt, daß Ammoniumphosphat als N-Quelle für Schimmelpilze bei weitem höhere Mycel-Ernten liefert als das schwefelsaure und salzsaure Salz. Mir erschien das Phosphat nicht als geeignet, da so die physiologisch wertvolle Phophorsäure in größeren Mengen

in die Nährlösung eingeführt wird, die eventuell auch eine höhere Mycelausbeute verursachen könnte. Das Sulfatsalz wiederum wurde dem Chloridsalz vorgezogen, da letztere nach G. Ritter (37) das Wachstum mehr hindern als die Sulfate. Wie der Versuch über den Einfluß der Nährsalze auf die Pigmentbildung gezeigt hatte, war Ammon weder als Chlorid, Sulfat, Phosphat noch als Nitratsalz im Stande gewesen, Färbung herbeizuführen. Auffallend ist, daß auch Ammonnitrat nicht die Pigmentbildung hervorrufen kann, eine Erscheinung, auf die unten noch zurückzukommen ist. Bei Ammonsulfat wurde auch unter Wechsel der Kohlehydratquelle kein Pigment gebildet. Dies ist in der Hauptsache dem Umstande zuzuschreiben, daß das Salz physiologisch sauren Charakter hat, dadurch, daß der Stickstoff in Form des Ammoniaks assimiliert wird und die freiwerdende Schwefelsäure ein Wachstum und eine Pigmentbildung verhindert. Bei Kaliumnitrat (ebenso verhalten sich $NaNO_3$, $Mg(NO_3)_2$, $Ca(NO_3)_2$) hingegen wird der Stickstoff in der Nitrat-Form assimiliert. Das Kalium muß zum größten Teil als KOH, falls der Pilz nicht selbst Säure zu dessen Neutralisation produziert, in der Lösung bleiben.

Epicoccum purpurascens ist nun, wie folgender Versuch zeigt, außerordentlich empfindlich gegen freie Säure, sehr wenig empfindlich dafür gegen Alkali. Die Pigmentbildung erfolgt in Gegenwart von Kaliumnitrat als Stickstoffquelle üppig selbst bei Zusatz von freier Schwefelsäure und wird durch Zusatz von freier Kalilauge nicht gehemmt. Bei Ammonsulfat als N-Quelle dagegen tritt die Pigmentbildung nur bei schwach alkalischer Reaktion auf und nur in ganz geringem Maße. Der Stickstoff in seiner höheren Oxydationsform ist also unzweifelhaft in der Biochemie des Pilzes ein integrierender Bestandteil für die Bildung des Pigmentmoleküls.

Die Farbstoffbildung bei der Ernährung mit Ammonsulfat in Gegenwart von freiem Alkali scheint nur sekundär

zu sein, da sie nur minimal auftritt, eine Erscheinung, der wir bei den Aminosäuren als Stickstoffquelle wieder begegnen werden.

Versuchsanordnung.

Die Nährlösung enthielt bei Versuch

a) 0,3 % KNO_3 + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,01 % $MgSO_4$ 5 % Dextrose (dest. Wasser)

b) 0,3 % $(NH_4)_2SO_4$ + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,01 % $MgSO_4$ + 5 % Dextrose (dest. Wasser)

50 ccm dieser Lösungen wurden in 100 ccm Erlenmeyer-Kölbchen sterilisiert, die freie $n/_{10}$ Schwefelsäure und $n/_{10}$ Kalilauge wurde für sich sterilisiert und nach dem Erkalten vermittels steriler Pipetten zugesetzt.

Versuch a): KNO_3 als Stickstoffquelle.

Zugabe von ccm	Wachstum nach Tagen	Pigment nach Tagen	Reaktion bei Eintritt des Pigmentes	
10 ccm $\frac{n}{10}$ KOH	1	2	alkalisch	
5 „ $\frac{n}{10}$ KOH	1	3	„	
2 „ $\frac{n}{10}$ KOH	1	3	„	Intensive Pigmentbildung
1 „ $\frac{n}{10}$ KOH	1	5	„	
Neutral	1	5	„	
1 „ $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	1	9	sauer	
2 „ „	1	31	„	
5 „ „	nach 14 Tagen	—	—	
10 „ „	—	—	—	

Versuch b): $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle.

Zugabe von	Wachstum nach Tagen	Pigment nach Tagen	Reaktion bei Eintreten des Pigmentes
10 ccm $\frac{n}{10}$ KOH	Kein Wachstum	—	—
5 „ „	„	—	—
2 „ „	1	9	alkalisch } wenig
1 „ „	1	11	neutral } Pigment
Neutral	1	—	— farbl. Wachstum
1 ccm $\frac{n}{10}$ H_2SO_4	1	—	— „
2 „ „	Schwaches Wachstum	—	— „
5 „ „	„	—	—
10 „ „	—	—	—

Wie schon oben erwähnt, konnte selbst durch Ammonnitrat der Pilz nicht zur Farbstoffbildung veranlaßt werden. Dies ist insofern von Wichtigkeit, als man daraus ersehen kann, daß Epicoccum, wenn ihm Ammon und Nitrat in äquivalenten Mengen geboten wird, den Stickstoff aus der Ammonform zur Assimilation vorzieht. Man konnte ja annehmen, daß ein Nitratpilz, d. h. ein Pilz, der auf Kaliumnitrat bessere Mycelernten liefert als aus Ammonsulfat, bei Darbietung von Ammon und Nitrat nur das Nitrat assimiliert. Wie nachfolgender Versuch zeigt, ist dies nicht der Fall. Auf KNO_3 wird Pigment gebildet, auf NH_4NO_3 tritt es nur in Spuren auf und in $(NH_4)_2SO_4$ bleibt die Farbstoffbildung vollkommen aus. Die Reaktion ist im ersten Falle alkalisch, in den beiden anderen Versuchen sauer (nach 14 Tagen).

Diese Beobachtung bestätigt eine von G. Ritter (37) gemachte Angabe, daß sich die als „Nitratpilze“ bezeichneten Aspergillus glaucus, Mucor racemosus und Cladospo-

rium herbarum sich auf Kosten des Ammonstickstoffes mindestens ebensogut entwickeln, wie auf Kosten des Nitratstickstoffes. Epicoccum purpurascens zieht es also vor, den Ammonstickstoff ohne Pigmentbildung zu assimilieren, wenn ihm Nitrat und Ammon gleichzeitig geboten werden. Ob es sich bei der Pigmentbildung um die Wirkung eines Enzyms (Hydrogenase?), das den Nitratstickstoff reduziert, handelt, wagt Verfasser nicht zu entscheiden.

Versuchsanordnung:

a) 0,3 % KNO_3, 0,05 % KH_2PO_4, 0,01 % $MgSO_4$ + 5 % Dextrose (dest. W.)
b) 0,3 % $(NH_4)_2SO_4$, „ „ „ „
c) 0,3 % $(NH_4)NO_3$, „ „ „ „

a) Pigment nach 5 Tagen, intensivstes Wachstum,
b) Spur von Pigment nach 8 Tagen, gutes Wachstum,
c) Kein Pigment nach 14 Tagen, schlechtes Wachstum.

Weiterhin erschien es von Wichtigkeit, die günstigste Konzentration für die Pigmentbildung bei der Zugabe von Kaliumnitrat festzustellen. Das Optimum liegt ziemlich niedrig und ist absolut kaum festzustellen. Kulturen, die auf 1000 ccm Flüssigkeit 3 g KNO_3 enthalten, was einem Stickstoffgehalt von 0,4154 g = 0,04 % entspricht, zeigen schon nach 5 Tagen Pigmentbildung, Spuren von Nitrat bei Abwesenheit anderer N-Quellen fördern die Pigmentbildung wesentlich. Der folgende Versuch zeigt, daß das Auftreten des Pigmentes durch Zusatz von N als KNO_3 in höherer Konzentration verzögert wird und die Pigmentbildung schließlich ausbleibt. Es scheint demnach in höherer Konzentration das Salz als Gift zu wirken.

Einfluß

von N in verschieden hoher Konzentration.

Konzentration des Stickstoffs im KNO_3	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1 % N.
Eintreten des Pigments nach Tagen	8	10	10	12	13	15	15	—	—	—

Die dritte Gruppe der anorganischen Stickstoffverbindungen, die Nitrite, können von Epicoccum purpurascens nicht als Stickstoffnahrung benutzt werden, es scheint sogar, als ob die Anwesenheit von Nitrit in einer 0,08 % N entsprechenden Menge giftig wirkt und das Wachstum vollkommen verhindert. W. Benecke (36) bezeichnet Nitrite für Eumyceten als gänzlich minderwertige oder vielleicht sogar als gänzlich ungeeignete Nahrung, was meine Beobachtungen für Epicoccum bestätigen.

Die organischen Stickstoffverbindungen.

Bei der Stickstoff-Heterotrophie ist es von hoher Wichtigkeit, ob man dem Pilz die organische Stickstoffverbindung, etwa Asparagin, als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle gleichzeitig, oder ob man ihm außer ihr noch ein Kohlehydrat als Kohlenstoffquelle zuführt. Die Betrachtungen derartiger physiologischer Vorgänge sind weit komplizierter als die verhältnismäßig einfache Ernährung durch Kohlehydrate mit anorganischen N-Qellen. Es seien zuerst Versuche besprochen, bei denen außer der N-Quelle noch Kohlehydrate (Traubenzucker) als Kohlenstoffquelle hinzugefügt wurden. Schon Nägeli (38) wies für Penicillium nach, daß Pepton und Zucker ein bei weitem besseres Nährmittel ist, als Pepton allein. Bei nachfolgenden Versuchen wurde von Pepton, auf dem der Pilz wenig Pigment bildete, und von anderen komplizierten Eiweißverbindungen abgesehen. Es schien

für eine Aufklärung, wenn sie irgend möglich war, zweckmäßiger, von den Bausteinen des so komplizierten Eiweißes auszugehen. Auch bei diesen Versuchen ist es von Wichtigkeit, die Reaktion zu beachten, da man sonst sich widersprechende Resultate erhält. Selbst die schwache Azidität der Aminosäuren bewirkt zuweilen ein Ausbleiben der Pigmentbildung. Es zeigte sich nach Neutralisation der Verbindungen, daß Epicoccum auf allen angewandten Aminosäuren, wie Glykokoll, Alanin, Leucin, Asparaginsäure (ebenso Asparagin), Glutaminsäure Pigment bildet, ebenso auf Tyrosin, Lysin, Arginin, Harnsäure, Hypoxanthin, allerdings nicht so intensiv wie auf Nitratnahrung, keine Farbstoffbildung fand statt auf Acetamid und Guanidin. Eine Erklärung dafür zu geben, wäre etwas gewagt. Man könnte fast geneigt sein, anzunehmen, daß die von H. Pringsheim (39) bezeichnete Aminosäurerestgruppe — NH.CH.CO — auch bei der Pigmentbildung durch Epicoccum von Wichtigkeit wäre. Pringsheim wies nach, daß die Stickstoffnahrung die Protoplasmafunktion der Hefe und gewisser Schimmelpilze insofern beeinflußt, als sie nur dann gärfähig sind, wenn sie mit einer die Aminosäurerestgruppe — NH.CH.CO — enthaltenden Stickstoffquelle genährt werden, wobei Harnsäure sich wie die Aminosäuren verhält. Acetamid und Guanidin dagegen, welche für den Pilz ebenfalls reiche Mycelernten liefern, also als geeignete N-Quellen fungieren können, tragen nicht zur Pigmentbildung bei. Es kann sich hier jedoch nur um eine feststellende Beobachtung, daß bei bestimmten organischen Stickstoffquellen in neutraler Lösung Pigment gebildet wird, handeln. Ob tatsächlich die Pringsheimsche Gruppe von eingreifender Bedeutung für den chemischen Aufbau des Pigmentes ist, kann nicht entschieden werden, zumal bei dem Einfluß von Nitrat als N-Quelle ganz andere physiologische Momente als die hohe Oxydationsstufe des Stickstoffes in Betracht kommen. Ebenso wurde oben die Vermutung ausgesprochen, daß vielleicht die Pigmentbildung

bei Ammonsulfat, wo sie nur in schwach alkalischer Lösung vorkommt, eine sekundäre sein könnte; eine Annahme, die bei den Aminosäuren eventuell auch am Platze wäre.

Versuchsanordnung:

Die Lösungen enthielten in dest. Wasser 10 % Traubenzucker, 0,075 % KH_2PO_4, 0,01 % $MgSO_4$ und die Stickstoffverbindung in einer 0,08 % N entsprechender Konzentration. Die Lösungen wurden sorgfältig mit Soda neutralisiert.

1.	Glykokoll	Pigmentbildung
2.	Alanin	„
3.	Leucin	„
4.	Asparaginsäure	„
5.	Asparagin	„
6.	Glutaminsäure	„
7.	Arginin	„
8.	Lysin	„
9.	Tyrosin	„
10.	Harnsäure	„
11.	Hypoxanthin	„
12.	Pepton	„
13.	Acetamid	keine Pigmentbildung
14.	Guanidin	„ „

Wie aus obigen Versuchen hervorging, wird bei Gegenwart von Ammon + Nitrat in der Nährlösung das Ammon zur Assimilation bevorzugt, die Pigmentbildung bleibt fast vollkommen aus. Um festzustellen, ob etwa Asparagin als Vertreter der organischen Stickstoffverbindungen imstande sei, die Pigmentbildung bei gleichzeitiger Gegenwart von KNO_3 zu verhindern, wurden nachfolgende Versuche angestellt. Das Ergebnis zeigt auch hier eine Bevorzugung des organisch gebundenen Stickstoffes unter nur geringer Farbstoffbildung, die man, wie schon oben erwähnt, etwa als sekundäre Pigmentbildung bezeichnen könnte. Die Kontroll-

kultur mit Kaliumnitrat als alleiniger Stickstoffquelle war intensiv rot.

Versuch: 5 % Traubenzucker, 0,05 % KH_2PO_4, 0,01 % $MgSO_4$ + a) 0,3 % KNO_3; b) 0,15 % KNO_3 + 0,15 % Asparagin. a) zeigte die übliche reichliche Pigmentbildung nach mehreren Tagen; b) ein besseres Wachstum als a), aber nur schwache Pigmentbildung.

Bei allen diesen Versuchen wurden außer den Stickstoffquellen verschiedener Natur noch Kohlehydrate als Kohlenstoffquellen hinzugegeben. Es wurden zur Untersuchung, ob organische Stickstoffquellen alleine imstande wären, Pigmentbildung zu veranlassen, Versuche in verschiedener Richtung angestellt. Pigmentbildung trat in Nährlösungen, die 2—10 % Glykokoll, Asparagin, Alanin (+ 0,05 % KH_2PO_4 + 0,01 % $MgSO_4$, neutralisiert durch Soda) enthielten, nicht ein, wohl aber bei sehr schwachem Wachstum auf Gipsblöcken, wenn diese mit der eben erwähnten Nährlösung getränkt wurden, wie schon oben im Kapitel „das Material" erwähnt wurde. Jedenfalls befindet sich bei dieser Ernährung der Pilz in einer Art Hungerzustand, worauf sein schwaches Wachstum hinzeigt, da er auf Gipsblöcken, die gleichzeitig mit Kohlehydrat + Nährlösung getränkt wurden, reichlich und üppig Mycel bildete. Vermutlich hat der Gips durch seine Verunreinigungen mit CaO und der damit verbundenen schwach alkalischen Reaktion einen gewissen Einfluß auf die Pigmentbildung.

Mycelernte und Bildung von Alkohol unter Zugabe verschiedener Stickstoffquellen.

Die Mycelernte läßt leicht den Nährwert der verschiedenen Stickstoffquellen erkennen. In dieser Richtung haben Czapek (40) und H. Pringsheim (39) Untersuchungen mit Schimmelpilzen angestellt. Czapek stellt für Aspergillus niger das Gesetz auf, daß Aminosäuren für Mycelernten die förderlichsten Stickstoffquellen sind. Pringsheim bestätigte

diese Beobachtung bei anderen Pilzen, wie Rhizopus tonkinensis, Mucor racemosus und Torula V. Als nicht diesem Gesetz folgende Ausnahme bezeichnet er Allescheria Gayonii, die auf anderen Stickstoffquellen ebensogut gedeiht. Für Epicoccum purpurascens wurde der Versuch außer mit verschiedenen organischen Stickstoffquellen auch mit Kaliumnitrat und Ammonsulfat durchgeführt, und gleichzeitig der gebildete Alkohol in der Nährlösung bestimmt. Auf Kaliumnitrat wurde erheblich mehr Mycel gebildet als auf Ammonsulfat, weshalb wir den Pilz wohl mit Recht als „Nitratpilz" bezeichnen können. In der Mycelausbeute auf organischen Stickstoffverbindungen erwies sich Asparagin bei weitem als beste Stickstoffnahrung, dann folgten Asparaginsäure, Harnsäure, Glykokoll, Acetamid und Alanin. Aus der Pringsheimschen Arbeit wurden zum Vergleich mit den bei Epicoccum gefundenen Resultaten die Befunde für Rhizopus tonkinensis herangezogen, die eine auffallende Aehnlichkeit in dem Verhältnis der Mycelernten wie in dem des gebildeten Alkohols aufweisen. Für Rhizopus tonkinensis ist die Reihenfolge: Asparagin (optimal), Asparaginsäure, Glykokoll, Acetamid, Alanin, Harnsäure. Ebenso auffallend ist, daß durch Epicoccum purpurascens wie durch Rhizopus tonkinensis auf Glykokoll und Asparagin die größte, und zwar bei beiden N-Quellen die gleiche Menge Alkohol gebildet wurde. Dann folgen bei Rhizopus Asparaginsäure, Alanin, Harnsäure, bei Epicoccum Asparaginsäure und Alanin (gleiche Mengen), weiter Harnsäure. Auf den beiden anorganischen N-Quellen wurde durch Epicoccum ebenso wenig Alkohol gebildet, wie auf Acetamid. Aus diesen Betrachtungen geht hervor, daß sich Epicoccum der von Pringsheim angeführten Gruppe von Pilzen anschließt, die auf N-Quellen mit der Aminosäurerestgruppe — NH.CH.CO — die beste Ausbeute an Alkohol liefern. Der Versuch bezweckte neben diesen Feststellungn

noch die Beantwortung der Frage, ob etwa die Älkoholbildung mit der Pigmentbildung in Zusammenhang zu bringen sei. Diese Frage ist unbedingt, wie aus der folgenden Tabelle zu ersehen ist, zu verneinen, da bei Ammonnahrung ebensowenig Alkohol gebildet wurde, wie bei Nitratnahrung. Dabei ist die Mycelernte von der Menge des gebildeten Alkohols unabhängig, was Pringsheim ebenfalls für mehrere Pilze nachwies.

Versuchsanordnung:

Stickstofffreie Nährlösung, 10 % Dextrose + 0,075 KH_2PO_4 + 0,01 % $MgSO_4$ (dest. Wasser) wurde nach Zugabe der N-Quellen, die in einer 0,08 % N äquivalenten Menge erfolgte, durch Soda neutralisiert. Versuchsdauer 30 Tage bei ca. 20° C. 200 ccm Nährlösung in 1 l Erlenmeyer-Kolben.

Das Gewicht der Pilzernte wurde nach Wägungen auf getrocknetem Filter festgestellt. Zum Vergleich mit den für Epicoccum gefundenen Resultaten werden die für Rhizopus tonkinensis von H. Pringsheim (39c) gegebenen Werte angeführt. Zu bemerken dabei ist, daß die Pringsheimsche Kultur auf entsprechenden Nährlösungen 8 Monate alt war, was starke Verluste durch Autolyse und Atmung im Gefolge haben muß, während das überaus schnelle Wachstum von Epicoccum ein Resultat binnen einem Monat ermöglichte. Die Alkoholbildung durch Epicoccum purpurascens war in einem Vorversuch durch Destillation vermittels der Jodoformreaktion im Destillat qualitativ nachgewiesen worden.

Zur quantitativen Bestimmung wurde die äußerst scharfe Bestimmungsmethode durch Pyknometer angewandt und der Alkoholgehalt aus der Tabelle von K. Windisch (41) bestimmt.

Die Bildung von Alkohol und der Mycelernte bei verschiedenen Stickstoff-Quellen.

(Die Werte für Rhizopus tonkinensis sind der Arbeit von H. Pringsheim (39c) entnommen.)

Art der Stickstoffquelle = 0,08 % N.	Epicoccum purpurascens		Rhizopus tonkinensis	
	g Mycelernte	% Alkohol	g Mycelernte	% Alkohol
Glykokoll	1,92	0,42	1,636	1,90
Alanin	1,54	0,26	0,801	1,29
Asparaginsäure	2,26	0,26	2,401	1,55
Asparagin	3,68	0,42	2,993	1,92
Harnsäure	1,32	0,16	0,666	1,17
Acetamid	1,45	0,11	1,187	0,10
Kaliumnitrat	2,75	0,11	—	—
Ammonsulfat	0,37	0,11	—	—

4. Der Einfluß der Reaktion.

Es ist bei Ausführungen über den Einfluß der Reaktion auf die Pigmentbildung auf das bei dem Einfluß der Stickstoffnahrung Gesagte zurückzukommen. Hier soll nur nochmals in zusammenfassender Form der Einfluß der Reaktion besprochen werden. Die Reaktion ist durch die Zusammensetzung der Nährlösung bestimmt. Ihr Einfluß kann sich auch dann äußern und von tiefgreifender Bedeutung sein, wenn von einer Nährlösung ausgegangen wird, deren Reaktion von vornherein neutral ist. Aus allen angestellten Versuchen geht hervor, daß freie Säure die Pigmentbildung verhindert, wenn Epicoccum auf Ammonverbindungen wie dem Sulfat, Chlorid, Phosphat und selbst dem Nitrat kultiviert wird (vergl. das Kapitel über Einfluß der Nährsalze). Es gelingt zwar, wie oben (S. 38, 39) gezeigt wurde, durch Gegenwart von freiem Alkali, etwa Kalilauge, eine schwache Pigmentbildung bei Ammonsulfat als Stickstoffquelle hervorzurufen. Bei Aminosäuren als Stickstoffnahrung ist das Eintreten der Pigmentbildung ohne vorherige Neutralisation der doch immerhin sehr schwachen Säuren zweifelhaft, und ist sie vorhanden, nur minimal. Sie wird deutlicher, wenn auch lange nicht so intensiv, wie bei Anwesenheit von Kaliumnitrat, wenn die Nährlösung durch Soda neutralisiert oder schwach alkalisch wird. Auf die physiologische Reaktion des Kaliumnitrats wurde schon wiederholt hingewiesen. Wichtig dabei ist, daß (wie aus obigem Versuche [S. 38, 39] hervorgeht), bei KNO_3 als N-Quelle auch in Gegenwart freier Säure Pigment gebildet wird. Eine

gewisse Bedeutung hat die Säurekonzentration sowohl für die Pigmentbildung, wie für das Wachstum. Es wird, wie die beiden Versuche auf S. 38 und 39 zeigen, das Wachstum durch die Anwesenheit von 5 ccm $n/_{10}$ Schwefelsäure auf 50 ccm Nährlösung sowohl bei Ammon- wie Nitratnahrung fast vollkommen verhindert. Dies würde im Liter-Nährlösung einem Säuregehalt von 90,909 ccm $n/_{10}$ H_2SO_4 = 9,0909 ccm n H_2SO_4 entsprechen, was sehr gering wäre. Auffallend andererseits ist es, daß der Pilz bei Nitratnahrung bei Zugabe von 10 ccm $n/_{10}$ KOH auf 50 ccm Nährlösung noch Wachstum und intensive Pigmentbildung zeigt, während bei Ammonsulfat als N-Quelle schon bei 5 ccm $n/_{10}$ KOH das Wachstum ausbleibt. Es ist also bei Untersuchungen auf das Verhalten von Pilzen gegen die Reaktion wohl zu unterscheiden, welche Stickstoffquelle ihnen dargeboten wird.

5. Der Einfluß des osmotischen Druckes.

Der Einfluß osmotisch wirksamer Substanzen auf die Pigmentbildung und das Wachstum von Epicoccum purpurascens wurde durch prozentuale Zugabe von Chlornatrium untersucht. Nach der von Pfeffer (42) angegebenen Tabelle zur Umrechnung osmotisch wirksamer Stoffe in Atmosphären wurde für den aus unterstehender Tabelle hervorgehenden Grenzgehalt an Kochsalz für die Pigmentbildung der Wert des osmotischen Druckes bestimmt, und mit einem ebenfalls nach Pfeffers Tabelle ermittelten Wert, der aus einem oben (S. 29) erwähnten Versuche über den Einfluß von Dextroselösungen verschiedener Konzentration auf Pigmentbildung verglichen. Die beiden auf verschiedene Art ermittelten Werte decken sich fast vollkommen und geben bei 61,06 bis 62,50 Atmosphären die Grenze für die Pigmentbildung an.

Versuchsanordnung:

5 % Dextrose, 0,3 % KNO_3, 0,05 % KH_2PO_4, 0,01 % $MgSO_4$.

Zeit des ersten Erscheinens von Pigment bei verschiedenen osmotischen Drucken.

% NaCl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15
nach Tagen	6	8	8	9	12	14	15	18	30			—	—
	reichlich Pigment						wenig Pigment	Spur Pigment	kein Pigment	Spuren von Wachstum			

Die Tabelle zeigt, daß bei zu hohem osmotischen Druck die Pigmentbildung ausbleibt, und daß sie sich durch Steigerung desselben verzögern läßt. Wie oben festgestellt wurde, blieb bei einem Versuch mit einem Gehalt an 50 % Dextrose die Farbstoffbildung aus. Nach der in Pfeffers Pflanzenphysiologie befindlichen Tabelle ist der osmotische Druck einer Lösung, die

auf 100 ccm 1 g NaCl enthält = 6,09 Atmosphären
auf 100 ccm 1 g Dextrose enthält = 1,25 „

Die Farbstoffbildung blieb aus:

1. bei 9 % NaCl = 9 × 6,09 = 54,81 „
   + 5 % Dextrose = 5 × 1,25 = 6,25 „
   Sa. 61,06 Atmosphären.
2. bei 50 % Dextrose = 50 × 1,25 = 62,50 „

Die Grenze des osmotischen Druckes für die Pigmentbildung liegt also bei 61—62 Atmosphären.

6. Der Einfluß der Temperatur.

Der Versuch wurde im Erlenmeyer-Kolben (100 ccm) mit 50 ccm Nährflüssigkeit (5 % Glukose + 0,3 % KNO_3 + 0,05 % KH_2PO_4 + 0,01 % $MgSO_4$) in 20 Thermostaten, die Temperaturen zwischen 7 und 60° C hielten, angestellt. Oberhalb 30° C unterblieb jegliches Wachstum. Bei 21—26° trat nach 5 Tagen Pigmentbildung auf, bei 19—17° nach 9 Tagen, bei 16° nach 11 Tagen, bei 13° nach 15 Tagen, bei 11° nach 16 Tagen und bei 8° nach 18 Tagen bei schwachem Wachstum. Bei 30° war Wachstum eingetreten, aber Pigmentbildung konnte nicht festgestellt werden. Dieser Versuch ergibt für Kultur und Pigmentbildung von Epicoccum purpurascens ein Optimum zwischen 21—26° C. Durch niedere Temperatur kann man die Pigmentbildung, wie das Wachstum verlangsamen, mit der oberen Temperaturgrenze korrespondiert das Ausbleiben der Pigmentbildung bei 30°.

7. Der Einfluß des Lichtes.

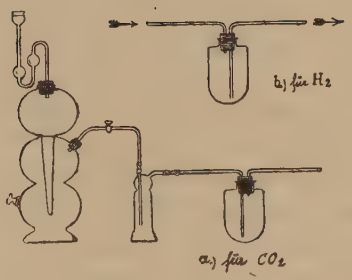
Zu diesem Versuche kamen Lindnersche Pilzgläser, die mit Pflaumendekoktgelatine beschickt waren, zur Anwendung. Diese Gefäße erschienen mir deshalb als die geeignetsten, weil sie gestatten, das Licht von allen Seiten an die Pilzkultur gelangen zu lassen, während bei Petrischalen und anderen Gefäßen die Beleuchtung der Kultur immer einseitig ist. Als besonders die Pigmentbildung befördernd, wurde schon öfters Pflaumendekoktgelatine angegeben. Diese wurde auf folgende Weise hergestellt. 500 g frische Pflaumen wurden in 1 Liter Wasser bis zum Mus gekocht, abfiltriert und zum Liter aufgefüllt, nach Zusatz von 12% Gelatine mit Soda neutralisiert. 4 mit dieser Nährgelatine beschickte Lindnersche Pilzgläser wurden gleichzeitig geimpft. Sofort nach der Impfung wurde ein Glas in eine dicht schließende Blechbüchse, die in einen schwarzen Papierkasten gestellt wurde, gebracht. Je ein Pilzglas wurde in die blaue bezw. gelbe Sachssche Glocke und ein Glas wurde dem diffusen Tageslicht ca. 3 m vom Fenster entfernt ausgesetzt. Die Sachsschen Glocken sind doppelwandige Glasglocken, die mit farbigen Flüssigkeiten gefüllt werden und so als Lichtfilter wirken. Die blaue Glocke ist mit Kupferoxyd-Ammoniaklösung gefüllt, die gelbe mit einer Lösung von doppelchromsauren Kali. Nach 4 Tagen wurde der Versuch unterbrochen. Alle 4 Kulturen zeigten gleichmäßiges Wachstum. Die Pigmentbildung war bei allen 4 Versuchen gleichmäßig, bei der

Kultur, die in vollkommener Dunkelheit gewachsen war, erschien sie sogar intensiver zu sein als bei den anderen. Der Versuch beweist, daß auf die Pigmentbildung bei Epicoccum purpurascens das Licht ohne Einfluß ist.

8. Der Einfluß verschiedener Gase.

Die wichtigste Frage hierbei ist wohl die, ob der Luftsauerstoff notwendig zur Pigmentbildung bei Epicoccum ist. Sie ist unbedingt zu bejahen, und zwar aus folgenden Gründen: 1. Der Pilz bildet bei submersem Wachstum nie Pigment; 2. durch quantitatives Ausschalten des Sauerstoffs gelingt es, die Farbstoffbildung wie das Wachstum zu unterdrücken, ohne den Pilz dadurch zu töten, z. B. in Kohlensäureatmosphäre; 3. durch Anwesenheit von Spuren von Sauerstoff tritt sowohl Wachstum wie Pigmentbildung ein in Wasserstoff- und durch Pyrogallol möglichst von Sauerstoff befreiter Stickstoff-Atmosphäre. Für den ersten angeführten Punkt bedurfte es keiner besonderen Versuche. Auf Nährlösungen, die sonst vollkommen zur Farbstoffbildung befähigen, wächst Epicoccum zunächst submers, und zwar farblos, wie zahlreiche Untersuchungen unter vielseitig wechselnden Bedingungen zeigten. Erreicht das Mycel die Oberfläche der Nährflüssigkeit, so tritt allmählich die Pigmentbildung ein. Um den Einfluß verschiedener Gase zu prüfen, wurden Lindnersche Pilzgläser, die mit Pflaumendekoktgelatine beschickt waren, geimpft. Zur Untersuchung kamen Wasserstoff und Kohlensäure, weiter wurde versucht, eine sauerstoff- und kohlensäurefreie Stickstoffatmosphäre herzustellen.

a) Der Einfluß der Kohlensäure. Die in einem Kippschen Apparat aus durch Kochen luftfrei gemachten Marmor + Salzsäure entwickelte CO_2 wurde nach Trocknen durch konzentrierte Schwefelsäure in ein wie oben beschrieben geimpftes Pilzglas geleitet.



Nach mehrere Stunden andauerndem Durchleiten von CO_2 wurden die zu Capillaren ausgezogenen Zuleitungsrohre zugeschmolzen. Nach 8 Tagen war kein Wachstum zu bemerken. Um zu kontrollieren, ob der Pilz noch lebensfähig war, wurde der Gummistopfen kurz gelüftet, worauf binnen 2 Tagen Wachstum und Pigmentbildung eintrat. Daß CO_2 die Pigmentbildung verhindern kann, wird bei dem Einfluß von Bakterien noch zu erwähnen sein. Ein weiterer Versuch dieser Richtung wurde mit Wasserstoffgas angestellt. Der Wasserstoff wurde im Kippschen Apparat aus Zink und Salzsäure entwickelt und durch $CuSO_4$-Lösung und H_2SO_4 geleitet. Sobald die Luft vertrieben war, wurden die Zuleitungsrohre zugeschmolzen. Bei diesem Versuche zeigte sich nach 5 Tagen schwaches Wachstum und Farbstoffbildung, was wohl auf minimale Anwesenheit von Sauerstoff schließen läßt. Um eine sauerstoff- und kohlensäurefreie Stickstoff-Atmosphäre zu erzeugen, bediente ich mich des auf S. 35 beschriebenen Apparates. Hierbei war die Waschflasche A mit Kalilauge (1 : 1) zur Absorbtion des CO_2, B mit konzentrierter Schwefelsäure und C mit alkalischer Pyrogallollösung zur Absorbtion des O_2 angefüllt. Hinter dem Pilzglas war wiederum eine Waschflasche mit Pyrogallollösung angebracht. Eine Wasserstrahlpumpe saugte einen langsamen Luftstrom durch den Apparat. Das Pilzglas wurde sofort nach der Impfung mit CO_2, wie oben angegeben, gefüllt und dann sofort die CO_2 vermittelst der

Wasserstrahlpumpe durch einen von CO_2 und O befreiten Luftstrom verdrängt. Darauf wurden die Zuführungsrohre zugeschmolzen.

Bei diesem Versuch trat nach mehreren Tagen Wachstum und Pigmentbildung ein, wie bei dem Versuch unter H_2-Gas. Es ist bekannt, daß es nur schwer gelingt, bei derartigen Versuchen den Sauerstoff absolut fernzuhalten. Das Resultat der CO_2-Atmosphäre zeigt also, daß in CO_2-Atmosphäre das Wachstum unterbleibt, die beiden anderen Versuche können dartun, daß in einer H_2- und N_2-Atmosphäre selbst bei Spuren von Sauerstoff Wachstum und Pigmentbildung eintritt.

9. Die Reizwirkung durch Bakterien.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß Bakterien durch chemische oder vitale Reize auf die Lebensfunktionen anderer Pilze von Einfluß sein können. Die Erscheinung, daß Nährböden, die sonst nicht ausreichend zur Pigmentbildung eines Schimmelpilzes sind, durch die Anwesenheit anderer Pilze oder Bakterien für die Farbstoffbildung geeignet werden, wurde von Döpelt (14) in seiner Arbeit über Pigmentbildung bei einer nicht näher bestimmten Penicilliumart, welche einen roten Farbstoff produziert, beobachtet. Bei meinen Untersuchungen zeigte sich, daß zahlreiche Schimmelpilze, die daraufhin geprüft wurden, auf die Pigmentbildung von Epicoccum purpurascens ohne Einfluß waren. Dagegen konnte bei einer spontan durch kurze Stäbchen infizierten Reiskultur (ohne besondere Zusätze) eine Farbstoffbildung beobachtet werden, wie sie sonst nur auf nitrathaltigem Reis gefunden wurde. Einer eingehenden Untersuchung in dieser Richtung stellen sich ziemliche Schwierigkeiten entgegen, da nicht ohne weiteres entschieden werden kann, ob die Ausscheidungsprodukte der Bakterien einen so integrierenden Bestandteil in der Ernährung wie das Nitrat ersetzen können, oder ob sie bloß einen vitalen Reiz ausübend, Epicoccum purpurascens zu einer intensiven Pigmentbildung etwa als Schutzmittel veranlassen. Es seien also nur kurz die Beobachtungen aufgeführt, ohne ihre biologische Bedeutung feststellen zu wollen. Es wurde der Einfluß folgender Bakterien in Reinkultur geprüft: Milchsäurebakterien (techn. aus dem Institut für Gärungsgewerbe), Granulo-

bakter polymxa (Beijerink), Buttersäurebakterien (4 B dickes Stäbchen), Bacterium acetosum (Essigsäurebakterium), Bacillus subtilis.

Als Nährboden diente Reis, der mit Leitungswasser im Dampftopf sterilisiert worden war. Auf die Kulturen wurde zunächst Epicoccum geimpft, welches auf diesem Nährboden üppig, aber nur mit sehr schwacher Pigmentbildung wächst. Nach einem Tage wurden die Kulturen mit den verschiedenen Bakterienreinkulturen geimpft. Ueppig rote Pigmentbildung veranlassen Bacterium acetosum und das Buttersäurebakterium (4 B dickes Stäbchen der Berliner Sammlung). Die mit Milchsäurebakterien geimpfte Kultur wurde bald gelbbraun. Auf den mit dem Heubacillus und Granulobakter polymyxa infizierten Kulturen wurde Epicoccum farblos und stellte bald sein Wachstum ein. Auf den anderen Kulturen dagegen wuchs der Pilz üppig. Die Verhinderung des Wachstums durch letztere läßt sich leicht erklären. Die Granulobakter-Kultur zeigte eine sehr starke Gasentwicklung. Nach W. Henneberg (43) bildet dieses Bakterium gewaltige Mengen Kohlensäure auf Getreidemaischen, neben geringen Mengen Butyalkohol (nur bei Luftabschluß), ohne Wasserstoff und Buttersäure zu entwickeln. Bei diesem Versuche ist es, wie der oben erwähnte „über den Einfluß der Kohlensäure“ beweist, nur diese, welche das Wachstum und Pigmentbildung verhindert. Der Heubacillus ruft nach Henneberg keine Gasbildung hervor, ist aber im Konkurrenzkampf mit anderen Pilzen, welche keine Säure produzieren, was bei Epicoccum der Fall ist, der Stärkere und pflegt auch Hefekolonien zu überwachsen. Die Versuche zeigen also, daß durch die Anwesenheit gewisser Bakterien, wie das betreffende Buttersäurebakterium und B. acetosum Epicoccum purpurascens zu besonders starker Pigmentbildung veranlaßt werden kann.

Versuche mit Nährgelatinen von bekannter Zusammensetzung.

Es war das Bestreben des Verfassers gewesen festzustellen, welche Ursachen notwendig sind, Epicoccum purpurascens zu möglichst intensiver Pigmentbildung zu zwingen. Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um eine Nährgelatine von bekannter Zusammensetzung darzustellen, die an Stelle der sonst angewandten Pflaumendekoktgelatine treten könnte. Dies konnte naturgemäß erst gelingen, nachdem die ernährungsphysiologischen Bedingungen für die Pigmentbildung in jeder Beziehung klar gelegt waren. Die obigen Versuche hatten einerseits gezeigt, daß die Anwesenheit von Magnesium in gewisser Konzentration und weiterhin Nitratsalze bei Abwesenheit von Ammonium und organischen N-Quellen die Pigmentbildung optimal beeinflussen. Auf der anderen Seite lag es nahe, chemische Analysen über Pflaumen heranzuziehen. Bei den Analysen organischer Stoffe fehlen meist Angaben über die Anwesenheit und den Charakter der anorganischen Stickstoffverbindungen. Ist die zu analysierende organische Substanz, wie etwa Früchte, nitrathaltig, so kommt dies in den quantitativen Analysen aus chemischen Gründen, die hier nicht weiter erörtert werden können, nicht zum Ausdruck. Weiter bietet es gewisse Schwierigkeiten Nitrate in so komplizierten Gemischen organischer Substanzen, die selbst eine Färbung zeigen, wie Pflaumen, auch nur qualitativ nachzuweisen. Wie aus Folgendem ersichtlich ist, konnte durch Zugabe von KNO_3 + Nährsalz + Kohlehydrat eine Nährgelatine hergestellt werden, die in jeder Beziehung dieselbe Pigmentbildung

lieferte, wie die Pflaumendekoktgelatine. Gelatinen, die aus folgenden Stoffen zusammengesetzt waren:

Ammonsulfat + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten keine Färbung.

Kaliumnitrat + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten intensive Purpurfärbung.

Asparagin + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten Spuren von Färbung.

Asparagin + Kaliumnitrat + Kohlehydrat + Nährsalze zeigten schwach rosa Färbung.

Es wurden also durch diese synthetischen Gelatinen die Resultate der oben angeführten Versuche, die meistens in Flüssigkeiten angestellt waren, experimentell auf festem Nährboden bestätigt. Von der Zusammensetzung der Gelatine sei nur die der nitrathaltigen genauer angegeben. Die Synthese der anderen Gelatinen erfolgte nach demselben Rezept unter Aenderung der N-Quellen.

100 g Pflaumendekokt-Lösung wurde verascht und ergab 0,1966 g Asche, also ca. 0,2 g, was 2,0 g für 1000 g Pflaumendekokt = etwa 1 l entspricht.

Nach König (*) enthält die Asche des Pflaumenfruchtfleisch

		auf 2 g Asche gerechnet
K_2O	69,36 % =	1,3872 g K_2O
Na_2O	2,3 % =	—
CaO	4,05 % =	—
MgO	4,86 % =	0,0972 g MgO
FeO	1,02 % =	—
P_2O_5	12,95 % =	0,2590 g P_2O_5
SO_3	2,46 % =	—
SiO_2	2,73 % =	—
Cl	0,3 % =	—

* Vergl. König, Chemie der menschl. Nahrungs- und Genußmittel Bd. II, pag. 956.

Diese Werte wurden für ihre Verbindungen umgerechnet, und zwar das Kalium auf Mono-Kaliumphosphat, das Magnesium auf Magnesiumsulfat (+ 7 aqua). Da in der Analyse sich die Werte für Kali und Phosphorsäure nicht decken, wurde nach der vorliegenden Arbeit angenommen, daß das übrige Kali als Nitrat im Pflaumenfruchtfleisch vorhanden ist, was folgende Werte ergab: Die oben angegebene Menge Kali = 1,3872 g entspricht 1,127 g Kalium. 0,2590 g P_2O_5 entsprechen 0,4966 g KH_2PO_4 = 0,1428 g Kalium. Die Analyse hatte einen viel höheren Kaliumgehalt =1,127 g ergeben.

Die Differenz muß also aus obigen Gründen auf KNO_3 berechnet werden:

1,127 g K — 0,1428 g K = 0,9842 g Kalium; 0,9842 g K entsprechen 2,543 g KNO_3.

Das Magnesium wurde auf Mg SO_4 + 7 aqua umgerechnet. Die berechnete Zusammenstellung ergibt an Nährsalzen pro Liter:

2,5430 g = 0,250 % KNO_3
0,4966 g = 0,049 % KH_2PO_4
0,5937 g = 0,059 % $MgSO_4$ + 7 aqua.

Zu erwähnen ist, daß diese berechnete Konzentration der Nährsalze mit der in der Arbeit gewählten, bei fast allen Nährlösungen durchgeführten Konzentration nahezu übereinstimmt.

Sie war dort: 0,3 % KNO_3, 0,05 % KH_2PO_4 und 0,01 % $MgSO_4$.7 aqua. Die berechnete Menge Nährsalze = 0,25 % KNO_3 + 0,05 % KH_2PO_4 + 0,06 % $MgSO_4$ (+ 7 aqua) + 5 % Kohlehydrat (2,5 % Traubenzucker + 2,5 % Maltose) + 12 % Gelatine, dest. Wasser mit Soda neutralisiert, ist ein farbloser, die Pigmentbildung von Epicoccum purpurascens optimal beeinflussender, fester Nähr-

boden, der sich auch für Demonstrationskulturen des Pilzes in Lindnerschen Pilzgläsern vorzüglich eignet. Die farbige Beilage ist eine Aquarellskizze einer auf diesem Nährboden gewachsenen Reinkultur von Epicoccum purpurascens (Ehrenberg).

Der Farbstoff.

a) Die Gewinnung.

Epicoccum purpurascens bildet sein purpurrotes Pigment innerhalb derjenigen Hyphen, die ein gewisses Alter erreicht haben, sich in direkter Berührung mit dem Nährboden befinden und nur in Gegenwart von Luftsauerstoff. Das Lindnersche Pilzglas leistet auch hier vorzügliche Aufklärungsdienste. Betrachten wir nun eine frische Kultur in einem mit Pflaumendekoktgelatine beschickten Rollzylinder:

Die sich binnen 24 Stunden gebildeten Hyphen sind zunächst farblos. Nach weiteren 24 Stunden, in denen ein neuer konzentrischer, weißer, der Gelatine anliegender Mycelring gebildet wurde, färbt sich das in den ersten 24 Stunden gebildete Mycel von der Mitte aus nach den Randzonen hin tief purpur und so geht es fort: An jedem Tage wird ein neuer weißer Mycelring außen gebildet und eine Zunahme der gefärbten Zone im Innern tritt ein. Vermutlich wird das weiße Mycel am Rande erst dann rot, wenn es beginnt, selbst für weitere Ernährung zu sorgen und die für seine Pigmentbildung notwendigen Stoffe assimiliert. Die Lufthyphen sind in Pilzglaskulturen immer farblos. Man sieht aus diesen Beobachtungen, wie leicht es ist mit Hilfe eines Lindnerschen Pilzglases einen tiefen Blick in die Biologie eines Schimmelpilzes zu werfen. — Es galt nun einen Nährboden zu finden, der einerseits farblos ist, andererseits die Farbstoffbildung optimal beeinflußt. Die von Lindner angewandte Methode auf möglichst vielen Plattenkulturen Pigment zu gewinnen, führt zu minimaler Ausbeute. Ein

billiges, für die Pigmentbildung äußerst günstiges Material ist Zucker-Melasse, die aber wegen ihrer natürlichen Farbe nicht in Betracht kommen konnte. Aus denselben Gründen wurde von der Benutzung von Pflaumendekokt abgesehen. Als vorzügliches Ausgangsmaterial erwies sich der Reis, der durch Kochen leicht sterilisierbar hervorragende Ausbeuten an Mycel liefert. Bei meinen ersten Versuchen erhielt ich meist nur bei ganz jungen Kulturen wenig rotes Pigment, während die alten gelb bis braun gefärbt waren. Es ist dies eine Erscheinung, auf die bei der Besprechung der chemischen Eigenschaften des Pigmentes näher einzugehen ist. Durch zufällige Infektion mit einer kurzen Stäbchenbakterie erhielt ich auf Reiskultur einmal besonders intensive Pigmentbildung. Es wurde deshalb versucht, durch Infektion mit bestimmten Reinzuchtbakterien Farbstoff zu gewinnen. Dieser Weg, der ja in der Technik der Gärungsgewerbe, wie beim Ansäuern der Brennereimaische durch Milchsäurebakterien häufig beschritten wird, wurde aus folgenden Gründen bald wieder verlassen: Das Wachstum des Pilzes wird durch die Reizwirkungen der Bakterien stark gehemmt und nach einmaligem Abernten einer Myceldecke gewinnen die Bakterien so die Oberhand, daß ein weiteres Wachstum von Epicoccum purpurascens unmöglich wird. Wie meine Versuche ergeben hatten, war Nitratnahrung sowohl durch seine physiologisch alkalische Wirkung als auch durch die chemische Beschaffenheit seines Stickstoffgehaltes besonders geeignet, die Pigmentbildung zu fördern. Weiter zeigte sich, daß Zusatz von 3 % Kochsalz wohl das Wachstum etwas hemmte, für die Pigmentbildung aber insofern von Vorteil war, daß der rote Farbstoff sich länger hielt und sich nicht so leicht in den braungelben verwandelte. Außerdem leistet Kochsalz als Desinficiens gegen gewisse Bakterien gute Dienste.

Es wurde deshalb folgendermaßen verfahren: Reis wurde mit Leitungswasser, welchem drei Gewichtsprozente

Kochsalz zugesetzt wurden, durch Kochen sterilisiert, wobei er vollkommen aufquellen muß. Naturgemäß kann es sich hierbei nur um eine praktische Sterilität handeln. Zur Anwendung kamen größere eiserne Gefäße. Sobald die Reiskörner aufgequollen waren und eine reichliche Dampfentwicklung auf Sterilität des Gefäßes schließen ließ, wurden die Behälter mit Pergamentpapier bedeckt. Nachdem Erkalten des Reises eingetreten war, wurde geimpft. Als Impfmaterial diente Mycel, das, wie bei allen anderen Versuchen, von der reingezüchteten Spore stammte. Dieses Mycel wurde in großen Jenenser Kolben (2—4 Liter fassend) in einer Nährlösung, die 10% Dextrose 0,3% KNO_3, 0,05 Prozent KH_2PO_4 und 0,01% $MgSO_4$ enthielt, gezüchtet. Das Nitrat wird dabei den Reiskulturen also nur durch das Impfmaterial zugeführt.

Das submers wachsende Mycel wurde häufig durchgeschüttelt, um eine möglichst feine Verteilung und größere Ausbeute zu erzielen. Binnen 8 Tagen erhält man soviel auf diese Weise gezüchtetes Mycel, um einige Gefäße mit etwa 3600 qcm großer Oberfläche reichlich impfen zu können, indem man die Flüssigkeit mit dem Mycel über den Reis gießt. Bei vorsichtigem Impfen ist eine Infektion der Kultur so gut wie ausgeschlossen, da das Mycel geradezu rapide wächst und den Reis durch eine dichte Decke von der Infektion anderer Mikroorganismen bewahrt. Dies Verfahren gestattet es, mehrere Male die an der der Kultur zugewandten Seite intensiv purpur gefärbte Mycel-Decke abzuheben und zur chemischen Untersuchung heranzuziehen.

b) Der Farbstoff.

Schon die Beobachtungen der Pilzglaskulturen hatten vermuten lassen, daß der wunderbar intensiv purpurrote Farbstoff von Epicoccum purpurascens von kurzer Dauer

ist. Sei es, daß der Farbstoff biochemisch verändert wird, oder sei es, daß der Sauerstoff der Luft auf ihn einwirkt. Das zuerst strahlend dunkelrot erscheinende Pigment wird beim Absterben der Kultur gelbbraun und mißfarben. Die angestellten Versuche, die lediglich als Vorarbeit zu einer umfassenden Untersuchung über die chemische Natur des Pigmentes angesehen werden können, zeigten bald, daß das rote Pigment tatsächlich sich auch chemisch leicht verändert und in einen gelbbraunen Farbstoff übergeht, der in konzentrierter Lösung bei durchfallendem Lichte allerdings auch tiefrot erscheint. Es sei zur Beschreibung des Pigmentes folgender Weg einzuschlagen: 1. das purpurrote Pigment, 2. das daraus entstehende rotgelbe Pigment und 3. der Versuch zu einem Vergleich mit anderen durch Schimmelpilze gebildeten Farbstoffen.

1. Das purpurrote Pigment.

Bei älteren Kulturen des Pilzes ist häufig zu beobachten, daß sich oberhalb der Myceldecke kleine gelbe bis dunkelrot gefärbte Tröpfchen bilden. Diese Tröpfchen kann man mittels einer Capillare sammeln. Die gesammelte Flüssigkeit ist gelb gefärbt, selbst wenn sie auf der Myceldecke als rot erschien. Setzt man zu dieser Flüssigkeit eine Spur Ammoniakwasser, so färbt sich diese Lösung deutlich rot.

Durch Extraktion des Mycels von möglichst jungen Kulturen mit Alkohol, Alkoholäther, Methylalkohol erhält man nach dem Filtrieren eine schön rot gefärbte Lösung, welche Fliespapier und Watte rot färbt. Durch Betupfen mit verdünnten Säuren, HCl, H_2SO_4, HNO_3, $CH_3.COOH$, geht die rote Färbung in gelb über und diese gelbe Färbung wird durch Alkali oder Ammoniak wieder rot. Setzt man zu dem Alkoholätherauszug eine Spur konzentrierter H_2SO_4, so färbt sich die Flüssigkeit orangegelb. Durch Zusatz von NH_3-Wasser tritt die rote Färbung wieder auf, und zwar in

der über der $(NH_4)_2SO_4$-Lösung stehenden Alkoholätherschicht. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß es sich bei dem Farbstoff von Epicoccum purpurascens um eine Art Indikator handelt, der sich mit Säuren gelb, mit Alkali rot färbt. Lösungsmittel für das Pigment aus dem Mycel sind Alkohol, Methylalkohol, Alkoholäther. In Wasser ist es sehr wenig löslich, unlöslich ist es in verdünnten und konzentrierten Säuren HCl, H_2SO_4, HNO_3, CH_3-COOH, NaOH, KOH, Soda, NH_3 Wasser, in Aether, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Ligroin, und Petroläther. Die Lösungen in den erwähnten Lösungsmitteln hinterlassen nach Abdunsten derselben eine braunrote amorphe Masse, die sich zum Teil wieder in den Lösungsmitteln, aber in braunrotgelber Farbe lösen. Eine Reinigung des Farbstoffes wurde durch Kapillarisation nach Goppelsröder (44) versucht. Diese Methode beruht auf verschieden schnellem, kapillaren Emporsteigen von chemisch verschiedenen Stoffen und wurde zur Untersuchung derartiger Farbstoffe mit Erfolg angewandt. Es gelingt so durch wiederholtes Lösen und Kapillarisieren eine rein rote Lösung zu erzielen, mit der allerdings, da zu wenig Material vorlag, noch keine chemischen Untersuchungen vorgenommen werden konnten. Verfasser wird dieser Arbeit eine weitere über den chemischen Charakter des Pigmentes von Epicoccum purpurascens folgen lassen. Das Spektrum des alkalischen Auszuges des purpurroten Pigmentes wurde geprüft und mit der Angabe von Herrn Tschirch als übereinstimmend gefunden (vergl. pg. 18).

2. Das braunrote Pigment.

Die purpurrote alkoholische Lösung nimmt binnen kurzer Zeit eine braunrote Färbung an, die durch Alkoholäther-Auszug gewonnene Lösung erst nach einigen Wochen. Diese Lösungen färben nicht mehr rot auf Watte und Fließ-

papier, sondern braungelb, zeigen vor allem auch den Farbenumschlag mit Säuren und Alkali nicht mehr. Sie erscheinen in konzentrierter Lösung bei durchscheinendem Licht tiefrot. Dies läßt darauf schließen, daß der rote Farbstoff sich leicht chemisch verändert und in einen braunroten übergeht. Alte Kulturen des Pilzes ergeben bei Extraktion nur diese braunrote Lösung. Die Lösungsmittel sind dieselben, wie für das purpurrote Pigment. Vielleicht ließe sich auf Umwegen über den braunroten Farbstoff die Natur des purpurroten feststellen. Versuche in dieser Richtung wurden zahlreich unternommen, aber bisher ohne eigentlichen Erfolg. Zu erwähnen ist, daß der braunrote Farbstoff in alkohol-ätherischer Lösung in etwas alkalischen, gesättigten H_2O Salzlösungen ($(NH_4)_2SO_4$ + Spur NH_3) unlöslich ist und im Scheidetrichter leicht von der Salzlösung getrennt werden kann. Dabei scheiden sich Verunreinigungen (etwa Eiweiß) aus. Die nun konzentrierte Lösung kann durch Zusatz von sehr viel Aether, in dem das Pigment, wie oben erwähnt, unlöslich ist, weiter eingeengt werden. Diese Lösung ergibt beim Eindampfen auf dem Wasserbad eine amorphe, braunrote Masse, die fast unlöslich ist in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Toluol, Ligroin und Petroläther. Leicht löslich ist dieser Rückstand in Aethyl- und Methylalkohol, in Eisessig, schwerer in Amylalkohol und Aceton, und zwar bei durchscheinendem Licht mit tiefroter Farbe, die auf Filtrierpapier und Watte braungelb färbt. Das Spektrum dieser Lösung zeigt sich übereinstimmend mit dem durch Prof. Tschirch (s. a. pg. 18) untersuchten alkoholischen Lösungen aus alten Kulturen des Pilzes. Kristalle konnten trotz vorsichtigem Verdunstenlassen dieser Lösungen nicht erhalten werden.

Zusammenfassend wäre über das Pigment von Epicoccum purpurascens also folgendes zu sagen: Der rote Farbstoff ist an der Luft sehr wenig haltbar und geht leicht in einen braunroten über. Das rote Pigment wird durch Säure

gelb und durch Alkali wieder rot, welche Eigenschaft das aus ihm entstandene braunrote Pigment nicht mehr zeigt. Die Lösungsmittel für beide Pigmente sind dieselben. Es scheint als ob der Uebergang des roten Farbstoffes in den braunroten auch im Inneren der Pilzhyphen vor sich geht, da alkoholische Auszüge von jungen Kulturen ein anderes Spektrum geben als diejenigen von alten.

3. Versuch zu einem Vergleich mit den Pigmenten anderer Schimmelpilze.

Da uns die Kenntnis der chemischen Natur dieser Pflanzenfarbstoffe so gut wie ganz abgeht, so fordern doch gewisse Aehnlichkeiten, besonders die des Farbenumschlages bei vielen Pigmenten von Schimmelpilzen, zu einem Vergleich heraus. Der besseren Uebersichtlichkeit halber wird die Tabellenform gewählt, in welche die Namen der Bearbeiter der Pigmentbildung aufgenommen sind, weiter die wichtigsten Lösungsmittel und die Färbung unter dem Einfluß von Säure und Alkali.

Ein Blick auf die Tabelle lehrt, daß die meisten Farbstoffe der niederen Pilze durch die Reaktion beeinflußt werden. Damit ist allerdings kaum eine Erklärung ihres chemischen Charakters gegeben. Es ist aber zu hoffen, daß bei genauem Studium nur eines dieser Pigmente das der anderen erleichtert wird. Den Farbenwechsel von rot in gelb durch Säure und von gelb in rot durch Alkali ist vorhanden bei Epicoccum purpurascens, Fusarium culmorum, Fusarium von Malz (roter Malzschimmel), Sterigmatocystis versicolor. Einen Farbenumschlag von rot in violett-blau durch Alkali und von violett-blau in rot durch Säure zeigen Aspergillus purpurascens, Fusarium a und b (Bessey), Fusarium hordei, Neocosmospora vasinfecta. Andere Pigmente, wie die der Monascusarten, Monascus purpureus und Physomyces hete-

Vergleichende Tabelle der bisher bearbeiteten roten Farbstoffe von Schimmelpilzen.

Zeichenerklärung: L = löslich, U = unlöslich, S = schwer löslich, — keine näheren Angaben.

Die Namen der Pilze in alphabetischer Folge	Die Farbstoffbildung wurde bearbeitet von	Die Wirkung der Reaktion auf den Farbstoff		Die Löslichkeit des Farbstoffes:							
		Sauer	Alkal.	Wasser	Aether	Alkohol	Methylalkohol	Chloroform	Säure	Alkali	Andere Lösungsmittel und sonstige Bemerkungen
1. Aspergillus purpurascens.	Van den Dries(8)	rot	violett	—	—	—	—	—	—	—	unlöslich in konzentr. H_2SO_4
2. Erreger des „Cowpea“	Smith (7)	„	farbl.	—	—	L	—	—	—	—	wahrscheinlich identisch mit 11
3. Epicoccum purpurascens	Verfasser	gelb	rot	S	U	L	L	U	U	U	Der rote Farbstoff geht leicht in einen braunroten über, der einen Farbenumschlag nicht mehr zeigt
4. Eurotiopsis Gayonii	Laborde (4)	—	„	—	—	—	—	—	—	—	Bei schwach saurer Reaktion rot. Bei alten Kulturen geht das Rot in Orange über.
5. Fusarium a und b	Bessey (12)	rot	blau	U	L	L	—	L	L	U	Der rote Farbstoff ist löslich in Benzol, Chloralhydrat, geschmolzenem Paraffin, seine blaue Form nur in sauren Lösungsmitteln.
6. Fusarium Culmorum	„	gelb	rotviolett	S	U	L	—	S	—	S	Löslich in alkoholischem Kali, wenig in H_2O Kalilösung.

9. Fusarium polymorphium	Matruchot (45)	rot	„	—	—	—	—	—	—	—	Der Farbstoff ist bläulich grün und wird durch Säure rot.
10. Monascus purpureus	Went (5) Ueda (6) Boorsma (46) Prinsen Geerlings (47)	orange rot	„	—	—	—	—	—	—	L	α-Oryzaerubin fluoresziert grün in NH_3-Lösung. Konzentr. H_2SO_4 gibt rotbraune, starke HCl und HNO_3 orangerote Färbung.
11. Neocosmospora vasinfecta	Bessey (12)	rot	violett	U	L	L	—	L	L	U	s. Bemerkungen für Fusarium a und b. s. Bemerkungen für 2.
12. Penicillium rot	Döpelt (14)	„	—	--	—	—	--	—	—	—	
13. Physomyces heterosporus	Harz (1)	gelb(?)	gelb(?)	—	—	L	—	—	—	—	Die rote alkoholische Lösung fluoresziert grün
14. Sterigmatocystis versicolor	Coupin u. Friedel (11)	„	rot	—	—	L	—	—	—	—	

rosporus haben gewisse Aehnlichkeiten miteinander; falls die beiden Pilze nicht identisch sein sollten. Es soll also hiermit nicht behauptet werden, daß diese Farbenwechsel auf eine gleiche chemische Natur der Pigmente schließen lassen, sondern es soll nur eine offensichtliche Analogie festgestellt werden, die weiteren Bearbeitungen etwa als Grundlage dienen könnte.

Zusammenfassung.

Die Bildung des roten Pigments von Epicoccum purpurascens Ehrenberg läßt sich durch seine Ernährungsphysiologie beliebig regeln.

1. Notwendig für die Farbstoffbildung ist die Anwesenheit von Magnesium in gewisser Konzentration.
2. die Anwesenheit von bestimmten Kohlehydraten, Monosen, oder gewisser Polyosen befördert die Pigmentbildung bei anorganischer Stickstoffnahrung, wie Nitraten, nicht bei Ammonnitrat. Die Bildung von Diastase wurde nachgewiesen.
3. Von tiefgreifendem Einfluß ist die Stickstoffnahrung. Vor allem ist es die Zugabe von Nitratsalzen wie KNO_3, $Mg\ (NO_3)_2$, $Ca\ (NO_3)_2$, mit Ausnahme von $NH_4\ NO_3$, welche die Pigmentbildung optimal beeinflußt. Es ist dabei sowohl der Einfluß der physiologisch alkalischen Wirkung der genannten Nitratsalze, wie der Einfluß der hohen Oxydationsstufe der Stickstoffverbindung, wie experimentell bewiesen wurde.
4. Es gelingt auch auf anderen Stickstoffquellen, wie Ammonsulfat, und organischen Stickstoffverbindungen (Aminosäuren), eine Pigmentbildung des Pilzes hervorzurufen, die allerdings nur sehr schwach ist und als sekundär bezeichnet werden kann, vorausgesetzt, daß die Reaktion neutral war. Die intensive, durch Nitrat veranlaßte Pigmentbildung bleibt in Gegenwart anderer, leichter assimilierbarer Stickstoffquellen, wie Ammonsalzen oder Aminosäuren, aus.

5. Die Reaktion ist durch den Charakter der Ernährung bestimmt. Sie verhindert bei Acidität die Pigmentbildung und fördert sie bei Alkalität. Es gelingt auf Kaliumnitrat als N-Quelle enthaltendem Nährboden auch bei saurer Reaktion Pigmentbildung hervorzurufen.
6. Durch hohen osmotischen Druck wird Pigmentbildung wie Wachstum unterbunden, ebenso fallen die Temperaturgrenzen für das Wachstum mit denen der Pigmentbildung zusammen. Der Farbstoff wird unabhängig vom Tageslicht gebildet. In CO_2 Atmosphäre wird Wachstum und Pigmentbildung unterdrückt, während beides in fast sauerstofffreier Wasserstoff- und Stickstoffatmosphäre eintritt. Gewisse Bakterien können die Farbstoffbildung befördern und für die Pigmentbildung unzureichende Nährböden zu genügenden machen.
7. Die Resultate der meist in Nährlösungen ausgeführten Versuche wurden durch Nährgelatinen bestimmter Zusammensetzung in jeder Beziehung bestätigt.
8. Die chemische Natur des Pigmentes konnte nicht festgestellt werden. Das rote Pigment wird durch Säure gelb und durch Alkali wieder rot, es ist löslich in Methyl- und Aethylalkohol. Der rote Farbstoff geht leicht in ein rotbraunes Pigment über. Eine beigefügte Tabelle zeigt gewisse Aehnlichkeiten des Pigmentes mit anderen früher untersuchten Farbstoffen von niederen Pilzen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der biologischen Abteilung des Institutes für Gärungsgewerbe, Berlin, unter Leitung des Herrn Professor Dr. Paul Lindner ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Lindner meinen besten Dank für die liebenswürdige Leitung meiner Studien und die Ueberlassung zahlreicher einschlägiger Literatur zu sagen.

Literaturverzeichnis.

1. Harz, Botanisches Centralblatt, Bd. 41 p. 378—379, 405—411. 1890.
2. Klein, Mitteilungen der österreichischen Versuchsstation für Brauerei und Mälzerei in Wien, Heft 5 p. 38—44. Wien 1892.
3. Constantin, J., Bulletin de la Société Botanique de France, Tome 15. p. 236 ff. 1893.
4. Laborde, J., Thèse présentée à la Faculté des Sciences de Paris. 1896.
5. Went, Ann. d. Sci. Nat. Bot. Sér. 8. T. 1 p. 1 ff. 1895.
6. Nyeda, Bot. Magazine. Vol. 15 Nr. 178, 1901, Vol. 16 Nr. 179. 1902
7. Smith, E. F. Bulletin Nr. 17. Division of Vegetable Physiology and Pathology. U. S. Department of Agriculture. Washington 1899.
8. van den Dries, La Cellule. Tome 13. fasc. 2 p. 415—446. 1897.
9. Smith, E. F. and Swingle. Bulletin Nr. 55, Bureau of Plant Industry, U. S. Department of Agriculture. 64 Seiten. 1904.
10. Schacht, Pringsheims Jahrbuch f. wiss. Bot. Bd. 3. 1863.
11. Coupin et Friedel, C. R. Acad. d. Sc. Paris T. CXXXVIII p. 1118. 1904.
12. Bessey, Flora od. Allgem. Bot. Zeitung 1904. Bd. 93 Heft IV p. 301 ff.
13. Milburn, Centralbl. f. Bakt. (II) Bd. XIII p. 129. 1904.
14. Döpelt, Annal. Mycol. Vol. 7. 1909 p. 315—338.
15. Trotmann, Journ. Soc. Chem. Inst. 1909 p. 1236.
16. Saccardo, Syll. IV 736.
17. Ehrenberg, Sylvae Mycol. Berolinenses. 1818 p. 12.
18. Link, Mag. Ges. Naturf. Fr. Berlin VII 1816. p. 32.
19. Lindau G., Rabenhorsts Kryptog. Flora. Leipzig 1909 Abt. IX p. 595.
20. Lindner P., Die bisher. Schimmelpilzforschung am Instit. f. Gärungsgewerbe. Wochenschr. f. Brauerei 1908, Nr. 12 und 13.
21. Saito K., Journal of the College of Science, Tokyo Vol. VIII. 1904 p. 1 ff.
22. van Iterson jr., Verslagen der Koninklyke Akademie van Wetenschappen 1903. Deel XI p. 699 ff.
23. Lindner P., Mikroskop. Betriebs-Kontrolle i. d. Gärungsgewerben 5. Auflage 1909 p. 380.

24. — Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1887. Bd. 5 Heft IV p. 155.
25. Saida K., Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1901. Bd. 19 p. 107.
26. Lafar, techn. Mykologie Bd. III p. 12.
27. Benecke W., Unters. über den Bedarf der Bakterien an Mineralstoffen. Botan. Ztg. 1907 Heft 1.
28. Pringsheim H. und Géza Zemplén. Hoppe-Seylers Zeitschrift 1909, Bd. 62 Heft 5 und 6.
29. Samkow S., Centralbl. f. Bakt. II. Abt. 1903. Bd. 11 p. 305.
30. Kossowicz Alex, Zeitschr. f. d. Landw. Versuchswesen Oesterreichs 1903. Bd. 6 p. 27.
31. Fischer E., Kohlehydrate und Fermente. Berlin 1909.
32. Beijerink, Bot. Zeitg. 1890 Bd. 48 S. 725.
33. Jost L., Biolog. Zentralbl. 1900 Bd. 20 S. 625.
34. Koch, Lafar, Kreislauf des Stickstoffs, Lafar Bd. III p. 11.
35. Zikes H., Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. Wien mathem. naturw. Klasse Bd. CXVIII Abt. I. Juli 1909.
36. Benecke W., in Lafars Handbuch Bd. I p. 402.
37. Ritter G., Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. Bd. XXVII 1909, Heft 10.
38. Nägeli C. von, Untersuchungen über niedere Pilze. München-Leipzig 1882, p. 67.
39. a) Pringsheim H., Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39 p. 4048. 1906.
b) — Biochem. Zeitschrift Bd. 3 p. 121. 1907.
c) — Biochem. Zeitschrift Bd. VIII p. 119. 1908.
40. Czapek, Beiträge zur chem. Physiol. und Pathol. **1**, 538; **2**, 557; **3**, 47; 1902|03.
41. K. Windisch, in W. Windisch, das chem. Laboratorium des Brauers.
42. Pfeffer W., Pflanzenphysiologie II. Aufl. p. 128.
43. Henneberg W., Gärungsbakteriol. Praktikum. Berlin 1909.
44. Goppelsröder Fr., Capillaranalyse. Basel 1901.
45. Matruchot L., Recherhes sur le développement de quelques Mucédinées. Thèse prés. à la Faculté d. Sciences de Paris 1892.
46. Boorsma W. G., Bydrage tot de Kennis van ang Khak. Geneeskundig Tydschrift vor Nederlandsch-Indie Deel XXXV p. 415—435. Batavia 1895.
47. Prinsen Geerlings H. C., Ang-Khak, ein chines. Pilzfarbstoff, Chemiker-Ztg. XIX Nr. 57 p. 1311. 1895.

Lebenslauf.

Ich, Karl Wilhelm Naumann, evangelischer Konfession, bin am 11. Oktober 1886 zu Leipzig-Plagwitz als Sohn des Kaufmanns und Bierbrauers Max Naumann geboren. Ich besuchte die Thomasschule in Leipzig, die ich Ostern 1905 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Bis Michaelis 1906 arbeitete ich im Betrieb und Kontor verschiedener Brauereien. Michaelis 1906 bezog ich die Universität Leipzig, um mich dem Studium der Botanik und Chemie zu widmen. Ab Ostern 1907 studierte ich an der Universität München, wo ich Februar 1909 im Chemischen Institut der Universität mein Verbandsexamen bestand. Seit Michaelis 1909 bin ich in Berlin immatrikuliert. Meine Dissertation fertigte ich in der biologischen Abteilung des Institutes für Gärungsgewerbe unter Leitung des Herrn Professor Dr. Paul Lindner an. Die Promotionsprüfung bestand ich am 14. Juli 1910.

Meine Lehrer waren in Leipzig: Correns, Drucker, Miehe, Pfeffer Schott, Wagner;

in München: v. Baeyer, Dieckmann, Dimroth, Giesenhagen, v. Goebel, v. Groth, Kofmann, v. Mayr, Piloty, Voll;

in Berlin: Emmerling, Kny, Rupp, Schmoller, Schwendener, Sering.